

ANDREI OLINESCU

# IMUNOLOGIE



Dr. ANDREI OLINESCU

# IMUNOLOGIE



EDITURA DIDACTICĂ ȘI PEDAGOGICĂ R.A. - BUCUREȘTI, 1995



**ISBN 973 - 30 - 3066 - X**

**Redactor: RODICA MIHĂILESCU**

**Tehnoredactor: ELENA OPRIȘEANU**

**Culegere și paginare computerizată: CARMEN MARINESCU, DRAGOȘ OPRIȘEANU**

**Coperta: DOINA BARANOVSKI**





## INTRODUCERE

Imunologia este știința care se ocupă cu studiul mecanismelor prin care organismul reușește să facă distincția dintre structurile proprii, pe care le acceptă, și cele străine lui, pe care le elimină. Aceste "structuri străine" sunt recunoscute datorită unor organizări moleculare particulare, diferite de cele specifice gazdei.

Ele pot proveni din exterior sau se pot forma în intimitatea organelor și țesuturilor și pot, în majoritatea cazurilor, genera răspuns imun specific care le neutralizează și elimină.

Această supraveghere imunologică permanentă este realizată de către un sistem complex denumit *sistemul imun*, alcătuit din *organe, celule și molecule* cu funcții bine definite.

Deși acumularea cunoștințelor în domeniul imunologiei teoretice se face într-un ritm extrem de rapid, totuși, există încă multe aspecte care-și așteaptă elucidarea. Desigur, acestea devin pe zi ce trece tot mai puține.

Știința imunologică actuală a fost generată de observarea unor fenomene biologice și patologice și de încercarea empirică de influențare a lor. Omul, din timpuri imemorabile, a observat că acei care au contractat o boală contagioasă și s-au vindecat spontan deveneau rezistenți la un nou contact cu bolnavii care sufereau de aceeași boală, în sensul că ei nu o mai contractau a doua oară. Această observație a avut o importanță covârșitoare, ea stând de fapt la baza imunologiei moderne. Se pare că prima semnalare scrisă a rezistenței dobândite față de o boală contagioasă o face TUCIDIDE, care descrie în anul 430 înainte de Hristos o epidemie în Atena, menționând că "același om nu era niciodată atacat a doua oară de boală, sau, cel mult, făcea o formă ușoară". Acești oameni puteau sfida tragediile generate de către epidemiile care secerau atâtea vieți.

Pe baza acestor observații, s-a început folosirea "agresorului" pentru neutralizarea propriei agresivități, prin inocularea deliberată a materialului infect bănuat a fi responsabil de producerea și difuzarea bolii. Cel mai utilizat, probabil pentru că era cel mai accesibil iar boala provoca epidemii groaznice, a fost conținutul pustulelor variolice, "inoculat" la persoane sănătoase. Procedul, denumit "variolizare", a fost aplicat pentru prima dată în China, de acolo a ajuns în Orientul Apropiat, pentru ca în anul 1721, Lady Mary WORTLEY MONTAGU, soția ambasadorului englez la Constantinopol, să-l introducă în Anglia, de unde s-a extins în Europa.

Variolizarea nu era însă lipsită de riscuri, deoarece pe de o parte provoca boala naturală, iar pe de altă parte, contribuia la difuzarea ei și menținerea rezervorului de virus.

În anul 1798, E.W.JENNER, un talentat medic englez, folosește pentru profilaxia variolei umane virusul variolei bovine ("vaccina"), înrudit antigenic cu cel al variolei omului, dar nepatogen pentru acesta. Cu acest eveniment crucial, se



încheie epoca observațiilor și practicilor empirice și se deschide era științifică a imunologiei.

La data de 9 VIII 1880, L.PASTEUR comunica în ședința Academiei Franceze reușita primei imunizări active din istoria omenirii, obținută cu germeni patogeni atenuați *in vitro*. Găinile, inoculate cu germenii atenuați ai holerei aviare, au supraviețuit infecțiilor experimentale cu doze cert letale. Ulterior, folosind aceleași procedee, el reușește să protejeze oile de infecția experimentală cu *Bacillus anthracis* și oamenii de infecția rabică, denumind acest procedeu de imunizare "vaccinare", denumire dată în onoarea lui JENNER, care a folosit pentru prima dată "vaccina".

Descoperirile în sfera microbiologiei se amplifică, generând în același timp embrionul unei viitoare științe: IMUNOLOGIA. După cum era și firesc, în faza "copilăriei" sale aceasta a fost total dependentă de microbiologie și virusologie, crezându-se că apărarea imună este prin excelență o funcție antimicrobiană. L.PASTEUR, prin vaccinare, a demonstrat că agentul infecțios provoacă boala dar are și puterea de a induce un răspuns imun protector. Prin atenuarea patogenității lui, se poate realiza disocierea dintre cele două efecte, reținându-se numai capacitatea protectoare. Așadar, observațiile clinice și datele experimentale demonstau fără echivoc că organismul, odată venit în contact cu un agent microbial, se poate apăra de el. Mai mult, la o nouă întâlnire cu același agresor, reacția lui de apărare este mult mai eficientă.

Dar care sunt mijloacele prin care se realizează aceste reacții protectoare?

În anul 1883, I.MECINICOV descoperă existența celulelor fagocitare și fenomenul de fagocitoză, lansând prima teorie celulară a imunității. Conform ei, agresorii bacterieni sunt "fagocitați", adică "mâncați" de către unele celule ale organismului, astfel că multiplicarea lor și lezarea organismului gazdă nu mai sunt posibile. Concepția "celulară" a lui MECINICOV a intrat în conflict cu cea "umorală", susținută de P.EHRLICH, E.A. von BEHRING și R.KOCH, care vedeau în anticorpi, și nu în celulele fagocitare, mijlocul principal de apărare imună. Ambele concepții erau corecte, numai că susținătorii lor nu dispuneau încă de informațiile necesare care le-ar fi permis acceptarea acestui fapt. P.EHRLICH recunoaște importanța utilizării unei metodologii riguroase în studiul anticorpilor, intuind că în reacția acestora cu agresorii (antigenele) sunt generate relații chimice stabile. Tot el lansează o teorie originală referitoare la sinteza anticorpilor și funcțiile lor de receptori la nivelul membranei celulare, teorie confirmată în cvasitotalitate de către cercetările actuale.

Astăzi, se poate afirma că evoluția imunologiei în ultimele 11 decenii a parcurs trei etape distincte.

Prima, cea de la sfârșitul secolului XIX și începutul secolului XX, era orientată aproape în exclusivitate spre problematica bacteriologică. Se studiau vaccinurile antimicrobiene, serurile imune, modalitățile practice de seroterapie, de serodiagnostic etc. În această etapă se aplică reacția de fixare a complementului și începe introducerea biochimiei în practica imunologică. Tot acum începe să devină evident faptul că nu numai bacteriile sunt antigenice, dar și țesuturile animale, și că procesele imune nu întotdeauna sunt benefice, febra de fân, astmul bronșic și altele fiind manifestări periculoase pentru organism mediate de către anticorpi.

A doua etapă debutează cam la jumătatea deceniului 2 al secolului XX cu cercetările de imunochimie ale lui K.LANDSTEINER și M.HEIDELBERG, care aveau ca obiectiv major studiul molecular al antigenelor și anticorpilor. Arne TISELIUS, Th. SVEDBEG iar mai târziu Rodney PORTER, Gerald Maurice EDELMAN și alții au adus contribuții remarcabile la înțelegerea structurii și pro-



prietățiilor fizico-chimice și biologice ale moleculelor de anticorpi. Tot acum se extind preocupările teoretice prin lansarea de teorii "instructive" opuse celei "selective" a lui P.EHRlich. Felix HAUROWITZ și Linus PAULING emit "teoria matriței", conform căreia antigenul ar acționa ca o "matriță" asupra anticorpului, imprimându-i o formă complementară care-l face să poată recunoaște specific "matrița" care l-a generat. Teoria, adoptată inițial fără rezerve, s-a dovedit ulterior a fi eronată.

A treia etapă, care marchează era modernă a imunologiei, debutează imediat după cel de-al doilea război mondial. Lucrările lui Peter MEDAWAR, Niels JERNE și Mac Fairlain BURNET revoluționează gândirea și cercetarea imunologică. În 1955-1956, M.F. BURNET lansează "Teoria Selecției Clonale" și a supravegherii imunologice, confirmată ulterior. În 1960, R. GOOD în S.U.A. observă că pacienții cu timoame sunt hipogammaglobulinici și prezintă diverse disfuncții imune. În același timp, J.F.A.P. MILLER începe în Australia o serie de studii privind rolul timusului în patogenizarea unor forme de leucemii virale la șoarece. Împreună cu R. GOOD, precizează rolul acestui organ în apărarea imună, demonstrând că timectomia neonatală alterează capacitatea de rejecție a alogrefelor și de sinteză a anticorpilor, efecte care nu se înregistrează în cazul timectomiei la adulți. De aici concluzia că timusul este un organ cu rol central în maturarea funcțională a efectorilor imunității. Câțiva ani mai târziu (1966), H.M. CLAMAN, folosind șoareci iradiați letal și reconstituiți cu celule din timus sau din măduvă osoasă, dovedește existența a două clase distincte de limfocite care participă la sinteza de anticorpi: una, educată în timus și denumită clasa "timo-dependentă" sau *T*, care nu sintetizează anticorpi dar ajută pe cea de-a doua clasă, educată în măduva osoasă și denumită *B*, care poate sintetiza anticorpii numai cu ajutorul limfocitelor *T*.

Prin aceste cercetări Imunologia face un salt uriaș, trecând de la obiectivul principal și aproape unic al studiului mijloacelor de apărare anti-infecțioasă la cercetări privind imunitatea de transplant, imunitatea antitumorală, genetica moleculară, natura și funcțiile receptorilor de membrană, mecanismele care stau la baza declanșării și reglării răspunsului imun etc.

În anul 1953, J.WATSON și F.CRICK descoperă structura moleculară a ADN, în 1956 G.D.SNELL definește complexul major de histocompatibilitate H-2 la șoarece iar M.SELA, în 1960, obține antigene sintetice care devin instrumente de mare valoare pentru înțelegerea condițiilor moleculare necesare declanșării unui răspuns imun. Amploarea pe care o iau cercetările imunologice și avalanșa de informații obținute de către diverse laboratoare a făcut necesară organizarea difuzării acestor informații, la început pe plan național și apoi internațional.

Se înființează, începând cu anul 1960, "Societăți de Imunologie" în S.U.A. și Anglia, apoi în Canada, Israel, Elveția, Franța, Australia etc. Dar, foarte curând a devenit evident faptul că sfera informațiilor trebuie să depășească limitele unui stat, pentru ca cercetătorii din diferite colțuri ale lumii să folosească aceeași terminologie și să-și efectueze cercetările în condiții "standard" care să fie reproductibile în oricare alt laborator.

Această necesitate a făcut ca la data de 5 mai 1969, la Bruges, în Belgia, societățile naționale de Imunologie din S.U.A., Anglia, Canada, Germania, Israel, Polonia, Suedia, Franța și Iugoslavia să se asocieze formând "Uniunea Internațională a Societăților de Imunologie" (UIS), ale cărei sarcini erau:

a) organizarea cooperărilor pe plan național și internațional ale cercetărilor de imunologie;



b) asigurarea ameliorării și dezvoltării problemelor de educație științifică, standardizare etc. în imunologia fundamentală și practică;

c) realizarea cooperărilor cu diferite alte organizații internaționale.

În țara noastră, prin hotărârea Prezidiului Academiei de Științe Medicale, la data de 12 februarie 1971 se înființează "Comisia Națională de Imunologie", care aderă la IUIS și care realizează obiectivele majore ale acesteia: colaborarea între cercetători, difuzarea informațiilor, stabilirea de legături cu alte societăți, standardizarea unor tehnici de lucru etc. Aceste obiective au putut fi îndeplinite prin manifestări științifice anuale organizate ca "reuniuni naționale de imunologie" în centrele de învățământ medical din București, Iași, Cluj-Napoca, Timișoara, Târgu-Mureș, Craiova, prin "seminarii metodologice", cursuri de imunologie etc. Din nefericire, datorită izolării impuse de un regim politic nefast, cercetarea imunologică românească nu a avut o ascendență firească deoarece, pe de o parte, sărăcia din dotarea materială a laboratoarelor și lipsa de informație științifică impuneau un ritm lent sau chiar o stagnare a activității, iar pe de altă parte, cercetătorii cei mai dotați foloseau orice prilej pentru a părăsi țara, angajându-se în laboratoarele occidentale unde-și puteau desfășura plin potențialul lor intelectual. Această masivă hemoragie de inteligență ne-a costat și ne costă încă foarte mult. În timp ce noi "stăteam pe loc", în lume acumularea de informații științifice devenea explozivă.

Unde a dus această acumulare? Astăzi știm că răspunsul imun se caracterizează prin specificitate, memorie și autocontrol, procese extrem de complexe, care au loc la nivel celular și molecular. Recunoașterea agresorului străin de către organism se face specific, de către "receptori" de pe membrana limfocitelor *T* și *B*, predestinate pentru această funcție. În organism există atâtea tipuri (clone) de limfocite *T* și *B* câte tipuri de antigene sunt în natură, fiecare clonă fiind specializată în recunoașterea unui singur determinant antigenic în condițiile în care el este asociat cu niște antigene proprii organismului, adică "sub restricția complexului major de histocompatibilitate (MHC)".

Sunt cunoscute genele care controlează sinteza moleculelor de imunoglobulină și sinteza receptorilor pentru antigen de pe membrana plasmatică a limfocitelor *T*, a fost descoperită existența unei mari populații de molecule de citokine cu rol de mesageri informaționali, se descifrează procesele biochimice de la nivelul citoplasmei declanșate ca urmare a fixării ligandului la receptorii de membrană etc.

Imunologia actuală este departe de sfera preocupărilor ei de la sfârșitul celui de-al II-lea război mondial. Ea nu mai este o ramură a bacteriologiei, ci poate cea mai complexă știință biologică de la care se așteaptă rezolvări în diferite domenii ale patologiei.

Complexitatea acestei științe face ca încercarea de a scrie o carte de imunologie de către o singură persoană să fie un act de mare curaj. Cu toate acestea, m-am hazardat să depun acest efort în speranța că experiența de mulți ani în acest domeniu mă va ajuta să selectez tot ceea ce este deja bine stabilit, astfel ca acei mai puțin informați să poată avea un material cât de cât selectat, care să le permită o mai ușoară înțelegere a acestei științe. În multe capitole din acest volum sunt puncte de vedere personale sau contribuții personale care, desigur, trebuie acceptate sub rezerva confirmării sau infirmării lor ulterioare. De asemenea, unele



figuri, fotografii, tabele sau alte date experimentale sunt obținute sau concepute în decursul anilor de cercetare experimentală.

Sunt total împotriva practicii de a scrie "cărți din cărți", deoarece aceasta este dăunătoare prin dezinformarea pe care o generează. Cărțile trebuie scrise doar de către cei care au lucrat și au o oarecare experiență personală în domeniul de activitate respectiv și nu de către cei cărora "li se pare că știu câte ceva".

Sper ca acest volum să fie util celor interesați și să ajute la înțelegerea unor probleme de imunologie teoretică și practică.

O valoroasă contribuție la apariția acestui volum au avut-o medicii Dana și Grigore LĂZĂRESCU, precum și d-nele Vasilica MITULEȚ și Elena-Violeta ENE, cărora autorul le aduce caldele sale mulțumiri.



## ANTIGENE

Prin *antigen*, termen folosit pentru prima dată în anul 1899 de către L. DEUTSCH, se înțelege acea entitate care poate induce declanșarea de reacții imune din partea organismului și poate reacționa specific cu produșii acestor reacții. Capacitatea de a induce reacții imune este cunoscută sub denumirea de *imunogenitate*, iar reacția specifică, *reactivitatea antigenică*.

Antigenele pot proveni din afara organismului; având deci origine *exogenă*, sau pot avea origine *endogenă*, formându-se în interiorul acestuia. Atunci când sunt recunoscute de către celulele sistemului imun ele declanșează o serie de procese, și anume:

- a) sinteza anticorpilor cu specificitate de recunoaștere pentru el;
- b) activarea proliferării policlonale sau monoclonale a limfocitelor;
- c) instalarea memoriei imunologice;
- d) în unele situații, poate induce un răspuns imun exagerat (hipersensibilitate), sau poate anula răspunsul imun (toleranță imunologică).

De regulă, există o relație directă între mărimea moleculei de antigen și capacitatea sa de a induce reacții imune considerându-se că, cu cât molecula este mai mare, cu atât antigenicitatea ei este mai evidentă. În general, antigenele au greutate moleculară între 4 și 20 KD deși există și excepții, cum ar fi insulina, care are greutate moleculară de 1-1,5 KD. O explicație a relației existente între dimensiunea moleculei și antigenicitatea sa ar fi aceea că moleculele mari sunt mai bine fagocitate și prelucrate de către celulele antigen-prezentatoare. De asemenea, moleculele mari ar avea mai mulți determinanți antigenici, putând stimula un număr mai mare de clone de limfocite *T* și *B*. În afară de dimensiunea moleculei, o influență majoră asupra conferirii condiției de antigen ar fi cea de "străin", de non-propriu (non-self). Prin termenul de "non-propriu" nu se înțelege ceva care în mod obligatoriu nu aparține organismului, ci un aranjament particular în secvența reziduurilor de aminoacizi din structura primară a lanțului polipeptidic. Acest aranjament particular care constă din amplasarea unui aminoacid într-o altă poziție decât cea care există la lanțul primar al proteinei proprii, poate fi expus la suprafața moleculei datorită conformației ei sterice și recunoscut ca străin, inducând reacții imune care vizează eliminarea lui.

Pot fi antigene substanțele de origine bacteriană, vegetală, animală, care din punct de vedere structural pot exista sub formă de molecule, celule sau țesuturi, iar din punct de vedere chimic pot fi proteine, glucide, lipide, glicoproteine, glicolipide sau acizi grași.



## CONDIȚII ȘI FACTORI CARE DETERMINĂ ANTIGENICITATEA

În general, există o serie de condiții pe care trebuie să le îndeplinească o substanță pentru a fi antigenică. Acestea se referă la molecula de antigen, la organismul care este stimulat și la modalitatea în care se realizează accesul antigenului la sistemul imun al organismului.

### CONDIȚII DEPENDENTE DE ANTIGEN

După cum menționam anterior, **greutatea moleculară** are un rol important în realizarea antigenicității, bune imunogene fiind moleculele cu greutate mai mare de 40 kD. Sunt însă situații în care molecule mici, ca de pildă glucagonul, cu greutatea de 3,8 kD, sunt imunogene, iar altele, cu greutate mare, cum ar fi gelatina sau dextranul, nu sunt imunogene. Se pare că imunogenitatea unor polipeptide cu greutate moleculară mică s-ar datora printre altele și legării lor la unele componente proprii organismului, care ar avea rol de "grupări purtătoare" făcându-le astfel accesibile limfocitelor.

Calitatea de **non-propriu**, de străin, de incompatibil, este o condiție esențială. Ea este determinată de structura sterică a moleculei care permite expunerea la suprafața ei a acelor secvențe de aminoacizi care nu se găsesc la proteinele organismului, fiind deci străine de acestea. Dacă, de exemplu, în lanțul primar polipeptidic al unei proteine, la pozițiile 125-130 sunt secvențele Arg-Lys-His-Leu-Asp-Tyr, iar la proteina altui organism secvența este Arg-Lys-Tyr-Asp-Leu, cea de a doua proteină, cu secvența ei străină este recunoscută ca non-proprie și eliminată de către sistemul imun al organismului în care a pătruns.

**Rigiditatea moleculei** este obligatorie deoarece, prin rotirea liberă în jurul axului propriu al moleculei a determinantilor ei antigenici, se pierde imunogenitatea, receptorii pentru antigen de pe suprafața limfocitelor fiind "păcăliți", în permanență prezentându-li-se alți determinanți. De exemplu, gelatina, deși are greutate moleculară mare, nu este imunogenă deoarece, datorită bogăției în reziduuri de Gly, este lipsită de rigiditate. Dacă însă i se mărește conținutul în Tyr sau în Trp, ori în Phe-Al, molecula devine stabilă și implicit antigenică.

**Izomerismul optic** influențează imunogenitatea, moleculele cu reziduuri de aminoacizi levogiri (*L*) fiind mai imunogene decât cele cu aminoacizi dextrogiri (*D*). Se pare că moleculele *L* sunt mai imunogene deoarece pot fi mai ușor degradate de către unele enzime cum ar fi pepsina, tirozina, papaina din fagolizozomii celulelor fagocitare. În urma degradării lor, se pot transmite mai rapid și mai eficient informațiile stimulatoare. De regulă, cu cât molecula de antigen este mai ușor desfăcută în părțile ei componente de către enzimele lizozomale ale macrofagelor, cu atât imunogenitatea sa este mai mare.

**Persistența moleculei** în organism și mai cu seamă a părților sale responsabile de inducerea răspunsului imun (determinanții antigenici numiți și epitopi) influențează imunogenitatea ei. Substanțele care sunt complet degradate, cum este cazul celor fagocitate de către granulocitele polimorfonucleare (PMN), nu pot stimula funcțiile imune, deoarece li s-a distrus componenta imunogenă specifică, respectiv epitopii. Atât eliminarea rapidă a antigenului cât și remanența sa ca moleculă intactă, nedegradată, în interiorul celulei fagocitare, scade antigenicitatea până la anularea ei. Pentru ca să fie bune imunogene, substanțele



străine de organism trebuie să rămână un anumit timp în intimitatea sistemului limfoid, timp care să nu fie nici prea scurt nici prea lung, adică să nu fie degradată nici prea rapid dar nici prea lent.

**Compoziția chimică a moleculei** are o importanță covârșitoare. Proteinele și glicoproteinele sunt foarte bune antigene, pe când lipidele, glucidele și acizii nucleici sunt slab imunogene.

**Modul de exprimare a epitopului** pe suprafața moleculei condiționează imunogenitatea sa. Dacă epitopii sunt ascunși în interiorul moleculei și, ca atare, nu sunt accesibili receptorilor pentru antigen de pe membrana celulelor sistemului imun, atunci recunoașterea lor nu se poate face, stimularea funcțiilor imune nemaiavând loc.

## CONDIȚII CARE SE REFERĂ LA ORGANISMUL GAZDĂ.

Una dintre ele este **maturitatea sistemului limfoid**, adică câștigarea competenței funcționale. Inocularea unui antigen la un organism incompetent imunologic, care încă nu și-a dezvoltat precursorii celulari, fiind lipsit de limfocite care să exprime receptori pentru el, nu numai că nu induce răspuns imun, dar poate duce chiar la toleranță sau paralizie imunologică.

**Vârsta organismului** poate influența răspunsul, de regulă la vârstele extreme, perinatală sau bătrânețe, acesta fiind mai slab decât la maturitate. Imediat după naștere, sistemul imun încă nu este suficient de matur funcțional, iar la vârstele înaintate intervin modificări fiziologice care provoacă declinul său. Acestea constau în special din scăderea funcțiilor limfocitelor *T*, creșterea procentului de limfocite *T* supresoare, scăderea activității celulelor *NK* etc. (tabelul 1).

Tabelul 1

Procentul limfocitelor *T* totale, al limfocitelor *T* supresoare (*T<sub>s</sub>*) și raportul CD4/CD8 la persoanele adulte și la bătrânii aparent sănătoși (valorii medii + DS a mediei)

Categoría de vârstă	Nr. subiecți	Procentul celulelor formatoare de rozete <i>E<sub>t</sub></i> și <i>E<sub>45</sub></i>		Raport CD4/CD8
		<i>E<sub>t</sub></i>	<i>E<sub>45</sub></i>	
Bătrâni	52	56,91 ± 2,80	24,40 ± 4,40	1,02 ± 0,15
Adulți	75	59,88 ± 1,50	14,42 ± 1,90	1,75 ± 0,09

*E<sub>t</sub>* = limfocite *T* totale; *E<sub>45</sub>* = limfocite *T* supresoare

Se instalează o imunodepresie fiziologică în mare măsură responsabilă de creșterea incidenței bolilor neoplazice.

**Condiția fiziologică a organismului** în momentul contactului cu antigenul influențează răspunsul imun. În cursul sarcinii, la persoanele tratate timp îndelungat cu corticosteroizi sau cu diverse substanțe imunodepresoare, stimulul antigenic poate fi inoperant deoarece organismul nu poate recepționa sau nu poate reacționa la intensitatea normală, fiziologică. Copiii cu atimie congenitală sau cei cu agammaglobulinemie legată de sex (sindrom Bruton) nu pot răspunde la stimuli cu antigene timodependente sau independente, ca de



altfel și persoanele infectate cu virusul imunodeficienței umane (HIV) care distruge limfocitele T.

**Specia animalului** este alt factor horăritor. Cu cât antigenul provine de la o specie îndepărtată filogenetic de specia căreia îi aparține animalul imunizat, cu atât acesta va dezvolta reacții imune mai puternice. Sunt însă și excepții de la această regulă, în sensul că antigene îndepărtate filogenetic nu sunt bune imunogene, deoarece au o conformație sterică și, deci, și o secvență primară a reziduurilor de aminoacizi apropiată până la identitate de cea a proteinelor organismului gazdă. Este cazul hemoglobinei de cal care nu este un bun antigen pentru iepure, sau al insulinei de cal și bou care este foarte apropiată structural de insulina umană și, deci, tolerată de om. La speciile apropiate filogenetic, cum este cazul omului și primatelor, diferențele de structură proteică sunt foarte mici și uneori aproape inexistente, așa că înlocuirea interspecie a proteinelor poate da un răspuns imun slab sau chiar nul.

## MODALITATEA DE ADMINISTRARE A ANTIGENELOR

Aceasta influențează în mod pozitiv sau negativ imunogenitatea, ca și comportamentul organismului la care acestea au fost inoculate.

Din acest punct de vedere, au importanță: *calea de inoculare, cantitatea inoculată (doza), intervalul dintre inoculări, asocierea cu adjuvanți* etc. De exemplu, multe antigene sunt mai imunogene dacă sunt inoculate intradermic sau intraganglionar, dovedindu-se slab omogene atunci când sunt inoculate pe cale subcutanată sau intravenoasă. În general, antigenele solubile, moleculare, sunt mai imunogene când sunt inoculate intradermic decât intravenos. Dozele prea mari sau prea mici pot avea efecte contrare celor scontate, în sensul că, în loc de răspuns imun pot induce toleranță imunologică "de zonă înaltă" sau de "zonă joasă".

Administrarea prelungită și la intervale scurte a aceluiași antigen poate realiza supresia și nu activarea funcțiilor imune. Un antigen poate stimula funcțiile imune mult mai eficient atunci când este administrat împreună cu un adjuvant sau sub formă de complex antigen-anticorp, deoarece este mai bine fagocitat de către macrofage și mai bine prezentat celulelor limfoide.

Deci, imunogenitatea unei molecule sau a unui complex de molecule este influențată de către un mare număr de factori dependenți de modul de alcătuire a antigenului, de organismul gazdă și de modul de acces la acest organism. Cunoașterea acestor condiții, în afară de valoarea lor teoretică, are o deosebită importanță practică, fiind foarte utilă în stabilirea corectă a unor scheme de vaccinare.

## ORGANIZAREA STRUCTURALĂ A MOLECULEI DE ANTIGEN

Din toată molecula de antigen, numai unele arii mici, cu suprafața de aproximativ  $7 \text{ m} \mu^2$ , accesibile celulelor sistemului imun, îi conferă specificitate antigenică, restul moleculei având rolul de "purător" al acestora.

Aceste arii, sau situsuri antigenice, alcătuiesc *grupările determinante* sau *epitopii* moleculei de antigen.



După cum se știe, atât proiectarea la exteriorul moleculei, cât și conformația acesteia, sunt condiționate de structura primară a lanțului polipeptidic și implicit de cele secundară și terțiară. Deci, epitopii nu sunt altceva decât niște segmente mai mari sau mai mici din lungimea unui lanț polipeptidic, la nivelul cărora amino-acizii se succedă într-o secvență particulară, formând determinahte secvențiale, care diferă de cele din lanțurile proteice ale gazdei și care generează formarea de situsuri antigenice cunoscute ca non-proprii de către sistemul imun al acesteia.

Pe suprafața unei singure molecule poate exista un număr diferit de epitopi cu specificități multiple, molecula nefiind de fapt un "antigen unic" ci un "mozaic de antigene", cu un număr mai mare sau mai mic de epitopi, număr condiționat de mărimea și complexitatea chimică a ei. De exemplu, pe o moleculă de ovalbumină cu greutatea de cca. 40 kD există 5 epitopi diferiți iar pe una de tireoglobulină cu greutatea moleculară de 700 kD există cca. 40 de epitopi.

— Epitopul are de fapt o funcție haptenică simplă, în sensul că poate reacționa cu anticorpul, dar nu poate declanșa singur sinteza acestuia. Pentru aceasta, este necesară intervenția unei componente care să-l "poarte", conferind complexului format o anumită dimensiune care-l face "vizibil", accesibil limfocitelor. Această parte de moleculă se numește "grupare purtătoare" sau, în terminologia anglo-saxonă, "carrier". Schematic, un imunogen este alcătuit dintr-o grupare purtătoare care-i conferă dimensiuni și accesibilitate și una sau mai multe tipuri de "grupări determinante" sau "epitopi" care-i conferă specificitate antigenică (fig. 1; fig. 2).

Rolul imunologic major revine epitopilor care, de regulă, sunt expuși în locurile cele mai periferice și mai accesibile ale moleculei. De obicei, un epitop este format din 15-20 de reziduuri de aminoacizi, dintre care numai 5-6 sunt esențiali. Ei sunt situați fie la extremitatea  $\text{NH}_2$  terminală a lanțului polipeptidic, cum este cazul epitopilor de la nivelul eritrocitelor sau mioglobulinei, fie de-a lungul lanțului, cum este cazul polizaharizilor pneumococici. În componența epitopilor se găsesc frecvent, cu pozițiile schimbate în secvența primară, Tyr, Phe-Al și Trp, deși și alte reziduuri pot conferi antigenicitate moleculei datorită schimbării poziției lor.

Din punct de vedere al organizării, epitopii sunt *continui* și *discontinui*. Epitopii continui sunt niște fragmente peptidice liniare, capabile să se lege la anticorpi, iar cei discontinui, care reprezintă majoritatea, au secvența reziduurilor principale

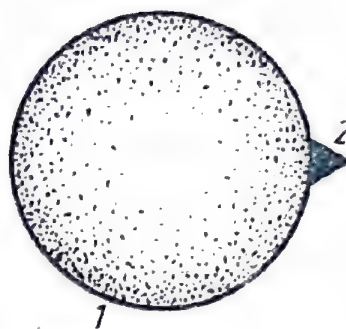


Fig. 1. Modul de alcătuire a antigenului. 1 - "gruparea purtătoare" sau "carrier"; 2 - "gruparea determinantă" sau "epitop". Pe gruparea purtătoare pot fi exprimați mai mulți epitopi cu specificități diferite, fiecare dintre ei fiind recunoscuți de către limfocite care au receptori specifici pentru ei. Epitopii conferă specificitate de recunoaștere ant genului, iar grupările purtătoare dimensiunile necesare pentru a putea fi recunoscut de către celulele sistemului imun.

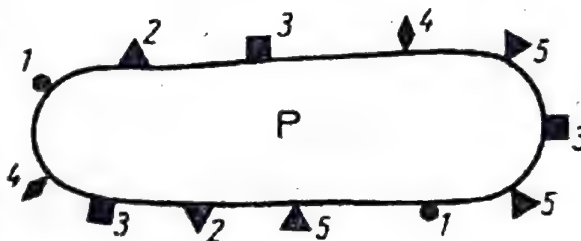


Fig. 2. Gruparea purtătoare (P) "poartă" mai mulți epitopi, cu specificități diferite (1,2,3 etc.)



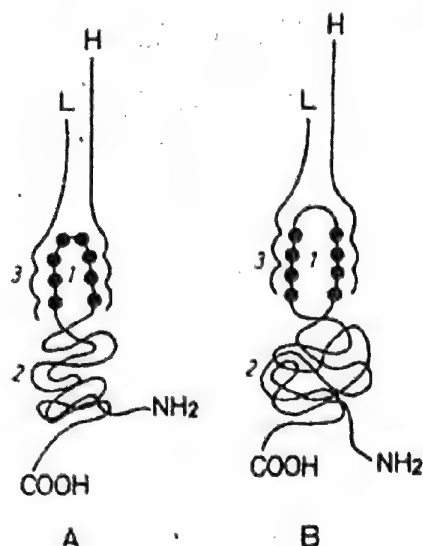


Fig.3. Epitopi "continui" (A) și "discontinui" (B). Pe gruparea purtătoare determinanții antigenici pot fi situați unul lângă altul (A), sau pot fi grupați la distanțe diferite (B) care însă, prin plierea moleculei, sunt recunoscuți de către anticorp exact ca și epitopii continui.

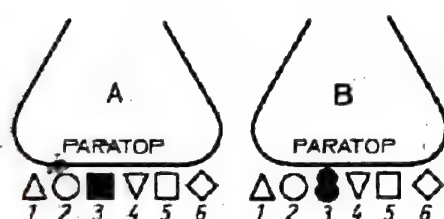


Fig.4. Înlocuirea unui epitop cu altul nu modifică substanțial potențialul de recunoaștere a antigenului de către anticorp (paratop). Anticorpul A recunoaște specific antigenul care are 6 epitopi diferiți, chiar dacă un epitop (3) este înlocuit cu altul.

întreruptă de reziduuri care nu participă la unirea cu anticorpul dar care, prin plierea lanțului primar, sunt îndepărtați de secvența din moleculă de către anticorpi, secvență numită "paratop" – care leagă epitopul antigenului. Așadar, segmentele discontinue ale epitopului sunt până la urmă apropiate unele de altele, realizându-se de fapt o continuitate a lor (fig.3). Epitopii discontinui sunt recunoscuți de către paratopii anticorpilor numai dacă molecula este intactă. Dacă este ruptă, fragmentele liniare individuale nu mai sunt practic recunoscute.

În orice caz, antigenicitatea epitopilor este influențată de către o serie de factori ca:

a. *Hidrofilia lor.* Reziduurile aminoacide hidrofili au tendința să fie expuse la suprafață și, deci, să aibă șanse crescute de a participa la alcătuirea epitopilor.

b. *Terminațiile NH<sub>2</sub> și COOH ale lanțurilor,* care de obicei sunt expuse la suprafață.

c. *Mobilitatea atomică a lanțului peptidic,* poziția multor epitopi pe moleculă corespunzând regiunilor de mare mobilitate.

d. *Acrofilicitatea,* adică accesibilitatea lor la structurile de recunoaștere imună ale organismului (anticorpi, receptori pentru antigen etc.)

e. *Amfipaticitatea,* care definește periodicitatea regiunilor hidrofili și hidrofobe.

De obicei, unele reziduuri de aminoacizi, din cele 5-6 care formează un epitop continuu, pot fi înlocuite cu altele fără ca această înlocuire să influențeze hotărâtor imunogenitatea peptidei respective (fig.4). Acest fapt sugerează că peptida liniară este de fapt discontinuă din punct de vedere antigenic, iar distincția dintre "continuu" și "discontinuu", din punct de vedere imunologic, este artificială. Dacă este așa, atunci înseamnă că numărul minim necesar pentru realizarea recunoașterii specifice a epitopului de către

paratop ar fi de 1-2 aminoacizi. Aceasta sugerează că de fapt, "recunoașterea imunologică" nu este altceva decât o "recunoaștere chimică".

Utilizarea ca sonde antigenice de segmente scurte, care corespund unor fragmente proteice, permite identificarea epitopilor din regiunile "mobile" iar a segmentelor lungi, a celor din regiunile mai puțin mobile ale proteinelor. De regulă, între epitop și paratop se pot stabili o serie de contacte, peptidele cu dimensiuni mai mari fiind capabile să adere la diferite subregiuni ale paratopului. În prezent se folosesc o serie de tehnici pentru localizarea epitopilor pe molecula de antigen, unele dintre ele fiind redată în tabelul 2.



Metode uzuale folosite pentru localizarea epitopilor la nivelul unei molecule de antigen  
(după M.H.V. Van REGENMORTEL)

Metoda folosită	Tipul epitopului recunoscut	Criteriul pentru identificarea rezidului implicat
Cristalografie în raze X a complexului antigen-anticorp	Epitop discontinuu care reacționează cu anticorpul omolog	Contact la interfața epitop-paratop
Folosirea fragmentelor de peptide ca probe antigenice de reacție încrucișată: 1. Peptide liniare 2. Peptide adsorbite pe faze solide 3. Peptide conjugate la grupări purtătoare 4. Peptide atașate la suportul folosit pentru sinteză	Epitopi continui care reacționează încrucișat cu anticorpi heterologi.	Legarea reziduală a fragmentelor liniare
Identificarea reziduurilor critice în fragmentul de peptidă prin studii de înlocuire sistematică	Epitopi continui conținând reziduuri esențiale, răspândite printre reziduuri irelevante	Abrogarea reactivității încrucișate după înlocuirea rezidului funcțional esențial
Utilizarea de anticorpi antipeptidici	Epitopi continui care reacționează încrucișat cu anticorpii heterologi	Inducerea de anticorpi care reacționează încrucișat

După cum spuneam, gruparea purtătoare poate "purta" un singur tip de epitop sau un număr multiplu de epitop, cu una sau mai multe specificități antigenice. Pentru fiecare dintre acestea, în populația de celule limfoide există un corespondent reprezentat de un număr restrâns de celule (clonă) de limfocite, care exprimă pe suprafața lor receptori unici și specifici. În general, antigenele de natură proteică au câte un epitop la fiecare 5 kD greutate și leagă un număr variabil de situsuri combinate, adică au valențe variabile în funcție de greutatea lor moleculară. Astfel, hemoglobina cu greutatea moleculară de 32 kD are 6 valențe, adică fixează 6 situsuri combinate, mioglobina cu greutate de 17 kD are 3 valențe, iar cea cu greutatea de 40 kD tot trei valențe, fapt care sugerează că molecula mare, de 40 kD, are o parte din epitopi "ascunși" în interiorul ei. Determinanții antigenici pot avea uneori o suprafață mai mare decât situsul combinativ al moleculei de anticorp. Anticorpii recunosc și se fixează pe epitop, deoarece acesta a fost partea de moleculă care a selectat clona cu receptori pentru el și a activat funcțiile ei în vederea sintezei lor. În afară de specificitatea pentru determinantul antigenic există și o specificitate pentru gruparea purtătoare, denumită și "specificitate carrier". Astfel, dacă unui animal i se inoculează un antigen format din gruparea purtătoare A și epitopul B, anticorpii formați vor recunoaște epitopul B. După al doilea stimul antigenic cu complexul AB, adică cu aceeași grupare purtătoare și același epitop, titrul lor va crește. Dar va crește și atunci când stimulul secundar s-a făcut cu același epitop atașat însă la o altă grupare purtătoare, de exemplu X, complexul inoculat fiind de data aceasta XB. Dacă însă, stimulul secundar se face cu gruparea purtătoare A, care nu poartă epitopul B ci un alt epitop, cum ar fi de



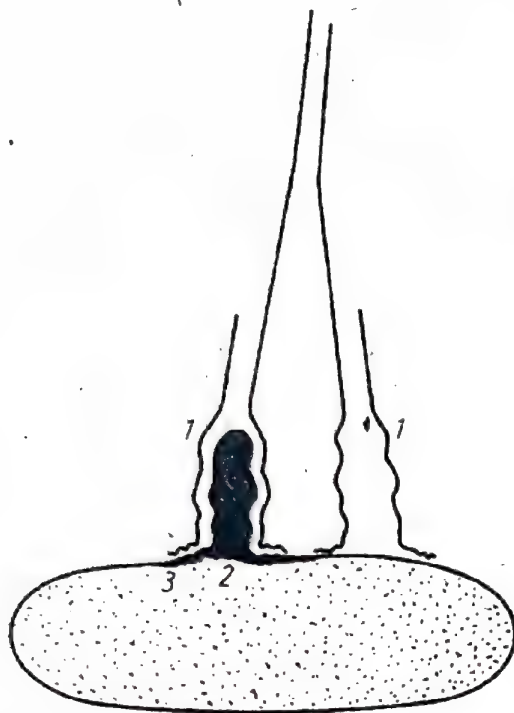


Fig.5. Molecula de anticorp, prin situsul său combinativ (1), recunoaște specific epitopul (2) de pe gruparea purtătoare dar, pe lângă acesta, mai recunoaște și o porțiune foarte mică din alcătuirea grupării purtătoare (3).

pildă Y, atunci sinteza anticorpilor anti-B nu va mai avea loc, existând tendința formării de anticorpi anti-Y și, în foarte modestă măsură, și a unor anticorpi anti-B. Acest fapt sugerează că celulele recunosc o suprafață din molecula de antigen ceva mai mare decât suprafața epitopului, și anume o porțiune mică din componența grupării purtătoare din imediata vecinătate a acesteia (fig.5).

## FACTORII CARE INFLUENȚEAZĂ SPECIFICITATEA ANTIGENICĂ

Specificitatea este influențată nu numai de către compoziția chimică a moleculei, dar și de conformația ei sterică, adică de poziția în spațiu a epitopilor sau chiar a unor atomi din componența acestora. Acest fapt devine evident atunci când pentru imunizări se folosesc substanțe identice din punct de vedere chimic, dar cu izomerism optic diferit. De exemplu, receptorii pentru antigen de la nivelul celulei limfoide pot distinge epitopi identici care diferă între ei doar printr-o simplă inversiune între poziția unui atom de hidrogen și o grupare OH, legate la același atom de carbon. Este cazul glucozei și galactozei, care se deosebesc din punct de vedere antigenic numai prin poziția în spațiu a grupărilor H și OH la atomul de C nr. 4. Specificitatea antigenică determinată de conformația sterică poate influența atât sinteza și aviditatea anticorpilor, cât și receptivitatea receptorilor pentru antigen de pe suprafața limfocitelor B sau T. De exemplu, iepurii imunizați cu albumină serică de cobai conjugată în poziția *orto*-, *meta*- sau *para*-, cu azobenzen, sulfat, fac forme de sensibilizare specifică fiecărui izomer optic, putând fi desensibilizați total numai cu izomerul respectiv, utilizarea celorlalți izomeri realizând doar o desensibilizare parțială. Așadar, atât imunogenitatea cât și specificitatea antigenică a moleculei sunt determinate de "epitop", o porțiune mică dar activă din moleculă, cu suprafața de 7-8 m<sup>2</sup> și greutatea de cca. 0,35-1,0 kD. Partea de moleculă pe care sunt fixate grupările determinante, adică partea care le "poartă", contribuie la recunoașterea antigenului de către limfocitele T și la declanșarea răspunsului imun specific. De fapt, specificitatea antigenelor naturale și în special a proteinelor de origine animală este multiplă, putând exista *specificități de specie, de grup, de organ* etc.

**Specificitatea antigenică de specie sau izoantigenică** (gr. *isos*=același).

Membrii unei specii au antigene specifice speciei lor, care nu există la alte specii. Așa se face că antigenele de pe suprafața eritrocitelor, leucocitelor, mușchilor striati, moleculelor de albumină, imunoglobulină etc., se deosebesc de cele existente la nivelul organelor, celulelor sau moleculelor analoage ale altor specii. Acest



gen de specificitate se numește "specificitate de specie" sau "specificitate izotipică" și este comună tuturor membrilor speciei.

**Specificitatea de grup sau "alotipică"** (gr. *allos*=diferit) este caracteristică numai unor grupe de indivizi și nu tuturor membrilor unei specii. Aceste antigene particulare, cu specificitate de grup, se numesc "aloantigene" și se întâlnesc în special la nivelul celulelor sistemului limfoid și pe lanțurile grele ale moleculelor de imunoglobulină. La nivelul eritrocitelor umane ar exista cca. 100 de determinanți antigenici diferiți, grupați în 20 de sisteme aloantigenice. Și la celulele prokariote este cunoscută deosebirea antigenică de specie și de grup. De exemplu, atât stafilo-cocii cât și salmonelele au determinanți antigenici care pot fi situați la diferite nivele ale celulei (fig. 6) și care au specificitate de specie, imunoglobulinele, cu funcție de anticorpi față de ei, putând face ușor distincția între cele două specii, în sensul că anticorpii antisalmonelele aglutinează salmonelele și nu stafilococi, iar cei anti-stafilococici aglutinează în exclusivitate aceste bacterii și nu altele. Dar în cadrul aceleiași specii există specificități de grup sau, conform denumirii uzuale, specificități serologice de "tip" (serotip) care permit distincția între diferite grupe de germeni. Aceeași situație este și la virusuri, unde specificitățile de grup pot fi foarte limitate ca număr, cum este cazul virusului variolic, sau foarte numeroase, cum este cazul virusului gripal. Determinarea serotipurilor bacteriilor și virusurilor patogene are o mare importanță practică, în special pentru epidemiologie.

**Specificitatea de organ** este caracteristică unor organe sau țesuturi fără să țină cont de specie. De exemplu, există unele organe cum ar fi ficatul, cristalinul etc, cu determinanți antigenici specifici lor, care nu sunt prezente la nivelul altor organe ale aceluiasi organism, dar care se găsesc exprimați pe cristalinul sau ficatul indivizilor aparținând altor specii.

**Specificitatea de "stadiu evolutiv" sau de "dezvoltare ontogenică"**. Caracterizează majoritatea celulelor organismului și în mod special pe cele care aparțin sistemului limfoid. De pildă, limfocitele *T* aflate în stadii timpurii de dezvoltare ontogenică exprimă unii epitopi care dispar atunci când celulele ajung la maturitate funcțională. La nivelul țesuturilor și lichidelor embrionare, există alfa-fetoproteina (AFP), un antigen specific acestui stadiu de dezvoltare timpurie a organismului, care la vârsta maturității practic dispăre, reapărând numai în cazuri patologice, ca de pildă în distrofiile și neoplaziile hepatice. Deci, există și specificități antigene patologice, care în mod normal lipsesc. Un interes deosebit din acest punct de vedere îl prezintă "antigenele neoplazice" sau "onco-fetale", cum ar fi antigenul carcinoembrionar (CEA) sau AFP amintită anterior. La subiecții

Fig.6. Localizări posibile ale determinantilor antigenici la nivelul unei celule prokariote (bacterii). 1 - peretele bacterian; 2 - membrana celulară; 3 - citoplasma; 4 - fimbrii sau cili, filamente. Imagine la microscopul electronic cu transmisie directă a bacteriei *Klebsiella pneumoniae* mărită x 24 000 (fotografie realizată de către dr. Alexandru Petrovici).





sănătoși, aceste antigene se găsesc în cantități extrem de mici, de ordinul picogramelor sau nanogramelor, pentru ca la pacienții cu cancer de colon sau cu leziuni hepatice, de pildă, să fie exprimate abundant atât în ser cât și la nivelul unor țesuturi sau organe.

## ANTIGENE HETEROFILE

Antigenele heterofile se găsesc exprimate la nivelul țesuturilor membrilor unor specii diferite și foarte îndepărtate filogenetic. Un exemplu tipic sunt antigenele *Forssman*, existente la mamifere, reptile, pești, bacterii și chiar la unele plante. Animalele care posedă antigenele *Forssman* se numesc *Forssman pozitive*, iar cele lipsite de aceste antigene sunt *Forssman negative*. Dacă se inoculează țesuturile unui animal *Forssman* pozitiv altuia *Forssman* negativ, se obțin anticorpi față de aceste heteroantigene care reacționează atât cu țesutul animalului donator cât și cu țesuturile animalelor aparținând unor specii foarte îndepărtate din punct de vedere evolutiv. În tabelul 3 sunt menționate unele specii de vertebrate *Forssman* negative și pozitive.

Tabelul 3

Specii de vertebrate *Forssman* negative și pozitive

Forssman negative	Forssman pozitive
Om (cu excepția grupului A)	Om (numai cei cu grupa A)
Cobai (cu excepția rinichiului)	Cobai (numai rinichiul), cal, vulpe, șoarece, leu
Cimpanzeu, gorilă, iepure, șobolan, bovine, rațe	Tigru, câine, lup, pisică, cămilă, capră, oaie

*Forssman* pozitive sunt și unele specii bacteriene, cum ar fi germenii din speciile *Salmonella*, *Shighella*, *Pasteurella*, *Clostridium*, *Neisseria*, *Pneumococcus* etc. În afară de antigenele *Forssman*, există și alte antigene heterofile. Este cazul antigenelor *Rh* prezente pe țesuturile maimuței *Macacus rhesus* și omului, la specia umană aceste antigene fiind "de grup", deoarece sunt indivizi  $Rh^+$  care le exprimă pe suprafața eritrocitelor și indivizi  $Rh^-$  care nu le exprimă. Există heteroantigene comune unor specii de mamifere și unor bacterii, cum este cazul celor prezente pe eritrocitele umane de grup *O* și pe agentul etiologic al ciumei umane (*Pasteurella pestis*) sau pe eritrocitele de grup *A* și virusul variolic. *Escherichia coli*, serotip *O*<sub>86</sub>, are un determinant antigenic comun cu aglutinogenul *B* din sistemul *ABO* uman, iar polizaharizii pneumococului serotip *XIV* au un antigen comun cu aglutinogenul *A* din același sistem. În serul oamenilor bolnavi de tifos exantematic apar aglutinine care reacționează cu *Proteus* *OX19* iar, serul celor cu mononucleoză infecțioasă reacționează cu antigenele termostabile ale eritrocitelor de oaie. Existența heteroantigenelor poate fi utilă, dar poate crea și multe dificultăți. De exemplu, antigenele comune rickettsiilor și proteusului stau la baza unor teste de laborator extrem de utile pentru diagnosticul tifosului exantematic (reacția Weil-Felix) sau mononucleozei infecțioase (reacția Paul-Bunell). Dar sunt și numeroase efecte negative. Astfel, oamenii cu antigene de grup *O* sau *A* reacționează mai slab la antigenele unor germeni cum ar fi pasteurelele sau virusul vaccinal, putând constitui în zonele





endemice de pestă sau variolă (înainte de eradicarea ei) adevărate rezervoare naturale. Organismele mamiferelor care au determinanți comuni cu cei ai bacteriilor sau virusurilor patogene pot să nu reacționeze imun, instalându-se toleranța imunologică față de acestea, sau în cazul în care reacționează, anticorpii produși vor distruge în cele din urmă și antigenele proprii, comune cu cele ale agentului invadator, provocând boli autoimune. Existența de antigene comune poate genera reacții imune încrucișate și în final autoagresiune. De exemplu, streptococul de grup A are antigene comune cu țesutul conjunctiv și cu mușchiul cardiac al omului, persoanele cu infecții streptococice îmbolnăvindându-se de reumatism sau endocardite.

— **Valența antigenelor.** Prin acest termen, împrumutat din chimie, se înțelege numărul de epitopi exprimați care pot reacționa cu situsurile combinate ale moleculelor de anticorpi. Așadar, o moleculă de antigen poate reacționa cu un număr de situsuri combinate egal cu numărul de determinanți antigenici pe care-l exprimă sau, altfel spus, valența unui antigen este valoarea dublă a moleculelor de anticorpi din clasa IgG cu care poate reacționa (trebuie să se țină cont că o moleculă de anticorp IgG are două situsuri combinate și deci, poate "lega" doi determinanți antigenici).

Determinarea valenței antigenelor se face prin reacții imunochimice de precipitare în exces de molecule de anticorp. Metoda nu este foarte exactă, mai ales în cazul antigenelor cu greutate moleculară mică, dar totuși este încă folosită. Cu ajutorul ei s-a stabilit că, în medie, o moleculă de antigen are 10-20 de epitopi, adică 10-20 de valențe și că, cu cât molecula este mai mare, cu atât și valențele ei sunt mai numeroase. De exemplu, ribonucleaza cu greutatea moleculară de 13 kD are trei valențe, toxina difterică de 72 kD are 8, iar hemocianina (extrasă din crustaceul *Meghatura crenulata*), care are o greutate moleculară mare, are 231 de valențe – adică 231 de epitopi pe moleculă.

## TIPURI DE ANTIGENE ȘI CRITERII DE CLASIFICARE A LOR

Toate substanțele obținute din bacterii, virusuri, animale vertebrate sau nevertebrate, din plante, precum și cele obținute artificial și sintetic, care au calitatea de antigen, au două atribute majore și anume: a) capacitatea de a declanșa reacții imune și b) proprietatea de a reacționa specific cu anticorpii sau receptorii pentru antigen de pe suprafața limfocitelor *T* sau *B*. Dar, nu toate antigenele dețin întotdeauna aceste două atribute majore. Unele pot declanșa reacții imune și pot reacționa *in vitro* cu producția acestor reacții, respectiv cu anticorpii, cu care dau precipitate sau aglutinate vizibile, din care cauză au fost denumite "antigene complete". Altele pot reacționa *in vitro* cu anticorpii, dar nu pot induce sinteza lor *in vivo* deoarece sunt molecule foarte mici. Acestea au fost denumite *haptene* (gr. *haptein* = a prinde, a atinge). Haptenele care dau reacții de precipitare cu anticorpii vizibile sunt *haptene complete*, iar cele care nu dau reacții vizibile sunt *incomplete*. Aceasta a fost una dintre primele încercări de clasificare a antigenelor.

Ulterior au fost adoptate și alte criterii (tabel 4; fig. 7). Se pare că cea mai corectă clasificare este cea care ține cont de clasele de celule care pot fi stimulate de către antigen, respectiv de limfocitele *T* și *B*. Pe baza acestui criteriu, antigenele sunt *timo-dependente*, adică necesită pentru recunoașterea lor prezența limfocitelor *T* și *timo-independente*, care pot stimula limfocitele *B* și în absența celulelor *T*.



Diverse criterii de clasificare a antigenelor

Criteriul de clasificare	Caracteristici	Proprietăți funcționale
	Antigena complete	Induc reacții imune <i>in vivo</i> Reacționează cu anticorpii <i>in vitro</i>
Capacitatea de a induce reacții imune și de a reacționa cu produșii acestor reacții (anticorpi) <i>in vitro</i>	Haptene complete	Nu induc reacții imune <i>in vivo</i> Formează cu anticorpii precipitate vizibile
	Haptene incomplete	Nu induc reacții imune <i>in vivo</i> Reacționează cu anticorpii <i>in vitro</i> , dar nu formează precipitate vizibile
Modul de formare	Naturale	Toate antigenele care există în natură
	Artificiale	Obținute artificial în laborator, prin iodurare, diazotare, dinitrofenilare, cuplare cu acid tartric etc.
	Sintetici	Obținute sintetic prin asocierea deliberată a aminoacizilor sub formă de: - Homopolimeri - Heteropolimeri - liniari - ramificați
Originea antigenelor	Animale	Diverse proteine, glicoproteine care formează antigenele de histocompatibilitate, de grup sanguin, enzimele, hormonii etc. Lipoproteine, glicolipide, acizi nucleici etc.
	Vegetale	Proteine, glicoproteine etc.
	Bacteriene, virale	Proteine, glicoproteine, lipopolizaharizi, polizaharizi etc. care intră în componența peretelui, capsulei, flagelilor, cililor
Specificitatea în raport cu specia proprie sau alte specii	De organ	Proprii unor organe ca ficat, rinichi, pulmon etc. care aparțin indivizilor unor specii diferite de mamifere
	De specie	Proprii tuturor indivizilor, aparținând unor specii de animale, plante, paraziți, bacterii etc.
	Heteroantigene	Antigene existente la indivizii unor specii îndepărtate filogenetic



Criteriul de clasificare	Caracteristici	Proprietăți funcționale
Sursa antigenelor	Externă	Provin din afara organismului (majoritatea antigenelor)
	Internă	Se formează în interiorul organismului prin denaturarea sau îmbătrânirea structurilor proprii
În raport cu condiția "normal"	Normale	Există în mod normal la nivelul țesuturilor, celulelor și umorilor organismului
	Patologice	Nu există în mod normal în organism în cantități decelabile, sinteza lor făcându-se numai în condiții patologice
Gradul de înrudire genetică	Autohton (autolog)	Proprii unui individ
	Singen (izoilog) <i>monozigot</i>	Antigenele provin de la indivizi aparținând aceleiași specii, identici între ei din punct de vedere genetic (inbred sau consangvini)
	Alogen (omolog)	Provin de la subiecții aceleiași specii, dar diferiți între ei sub raport genetic
	Xenogen (heterolog)	Provin de la subiecții aparținând unor specii diferite
După modul de reacție cu anticorpii	Precipitinogeni	Antigene (molecule) precipitate de către anticorpi
	Aglutinogeni	Sunt exprimate pe suprafața unor celule prokariote sau eukariote (bacterii, hematii, leucocite etc). În prezența anticorpilor, celulele aglutinează
Intensitatea răspunsului imun	"Slabe"	Slab imunogene
	"Tari"	Intens imunogene
Capacitatea de multiplicare	Nu se multiplică	Molecule (proteine, glicoproteine) sau celule inactivate
	Se multiplică	Virusuri, bacterii, paraziți, celule normale sau tumorale care se pot multiplica în interiorul organismului gazdă
În funcție de necesitatea prezenței limfocitelor T	Timo-dependente	Pentru a declanșa reacții imune au nevoie de prezența limfocitelor T (majoritatea antigenelor existente în natură)
	Timo-independente	Nu necesită prezența limfocitelor T, putând stimula direct limfocitele B. Sunt relativ puține (flagelina polimerizată, endotoxinele, polivinil-pirolidona etc), având epitopi care se succedă repetitiv



Criteriul de clasificare	Caracteristici	Proprietăți funcționale
În funcție de necesitatea de a fi prelucrată molecula de către celulele APC (prezentatoare de antigen)	Tipul I	Nu necesită nici un fel de prelucrare (fibrinogenul, proteinele <i>Listeria monocytogenes</i> )
	Tipul II	Nu necesită ruperea moleculei, ci doar desfacerea (desfășurarea) ei și evidențierea epitopilor (lizozim, mioglobină, ribonuclează)
	Tipul III	Necesită degradarea moleculei (ovalbumină, citocrom c etc.)

După proveniența lor antigenele sunt *naturale, artificiale și sintetice*.

## ANTIGENE NATURALE

Antigenele naturale, adică cele care se găsesc ca atare în natură, sunt proteinele, lipidele, polizaharizii, acizii nucleici sau glicoproteinele, glicolipidele, lipopolizaharidele (LPS) etc.

## PROTEINELE

Proteinele naturale sau cele modificate fizic sau chimic sunt de regulă bune antigene; lanțurile polipeptidice scurte și histonele sunt slab antigenice. Deci, pentru imunogenitate, importanța majoră au lungimea lanțului, secvența primară a aminoacizilor precum și reziduul aminoacidului terminal. Lanțurile polipeptidice scurte nu sunt imunogene; dar neimunogene sunt și cele lungi, alcătuite din unul sau doi aminoacizi.

Pentru a fi imunogene este necesar ca în structura primară a lanțului să existe minimum 3-4 reziduuri diferite de aminoacizi, care să înșiruie pe o lungime corespunzătoare capabilă să confere moleculei o conformație sterică particulară. Aminoacidul terminal nu are rol esențial în asigurarea imunogenității moleculei, dar este hotărâtor în determinarea specificității ei antigenice. Proprietăți antigenice au proteinele serice (albumina, alfa-, beta- și gammaglobulinele), proteinele din componența celulelor și

Fig.7. Clasificarea antigenelor după gradul de înrudire genetică a lor. 1- antigene "autohtone" sau "autologe", proprii unui individ; 2 - antigene "singene" sau "izologe", care aparțin unor indivizi identici din punct de vedere genetic (gemeni univitellini sau șoareci cosangvini); 3- antigenele "alogene" sau "omologe" aparțin indivizilor aceleiași specii dar diferiți între ei din punct de vedere genetic; 4 - antigenele "xenogene" sau "heterologe" aparțin subiecților care fac parte din specii diferite.



tesuturilor, hormonii, enzimele etc. Unele dintre acestea au o importanță majoră. Este cazul antigenelor de histocompatibilitate (MHC) care conferă individualitate antigenică țesuturilor fiecărui individ din cadrul aceleiași specii, antigenelor de grup sanguin (sistemele ABO, Rh etc.), al unor antigene ce la nivelul membranei plasmatică a celulelor sistemului imun care sunt "markeri" pentru acestea etc. În afară de aceste antigene "normale", în tumorile induse chimic sau viral se pot forma antigene noi, diferite de cele prezente în mod normal la nivelul țesuturilor din care s-a dezvoltat procesul neoplazic. Din cauza capacității lor de a genera răspuns imun care să realizeze rejecția tumorii transplantate la alți indivizi din cadrul aceleiași specii, aceste antigene au fost denumite "antigene de transplantare specific tumorale" sau TSTA (Tumor Specific Transplantation Antigens). Ele sunt recunoscute ca non-proprie de către gazda primară deoarece la nivelul celulei neoplazice pot apărea determinanți antigenici noi, care să fie recunoscuți de către efectorii sistemului imun și să se inducă rejecția (eliminarea) tumorii (TAA=Tumor Associated Antigens).

Este posibil ca genele care codifică antigenele MHC să fie implicate și în sinteza și exprimarea antigenelor TAA, între aceste două tipuri de antigene, respectiv între cele THC și TAA, existând relații genetice, structurale și funcționale. La rozătoare s-a dovedit că antigenele TSTA din celulele leucemice sunt de fapt un înveliș glicoproteic recombinat al virusurilor leucemiei cu greutate moleculară mică. Până în prezent nu s-a putut demonstra existența unor antigene specific tumorale și la nivelul tumorilor spontane, neinduse chimic sau viral, cu excepția melanomului cutanat malign la om, la nivelul căruia, cu ajutorul anticorpilor monoclonali, au putut fi puse în evidență astfel de antigene.

#### POLIZAHARIDELE

Polizaharidele se găsesc sub formă de poliozide liniare sau ramificate, în care un monozaharid este legat de alt monozaharid în lanț liniar sau ramificat, ramificație care, fie că pornește lateral de la un lanț central liniar, fie că pornește de la un punct central fără nici o simetrie. Lanțul specific lateral, precum arată și denumirea, conferă specificitate antigenică moleculei. Polizaharidele purificate au putere imunogenă slabă, unele dintre ele (acidul hialuronic) fiind chiar neimunogene sau imunogene doar pentru unele specii de animale. De exemplu, polizaharidul de tip III din capsula pneumococului este imunogen pentru șoarece și om, dar nu și pentru iepure sau cobai. Dextranii, cu greutate moleculară mare ( $10^4 - 10^5$  kD) secretați de către *Leuconostoc mesenteroides*, alcătuiți numai din unități de glucoză, sunt în anumite condiții imunogene pentru șoarece, dar nu și pentru iepure. În combinații moleculare cu lipidele și proteinele, stimulează formarea de anticorpi cu specificitate față de hidrații de carbon.

#### LIPIDELE

Lipidele sunt slab antigenice dar pot avea calități de haptene, mai ales atunci când sunt cuplate cu anumite proteine, situație în care se pot obține anticorpi anti-colesterol, -lecitină, -cefalină etc.

Mai bine studiate sunt proprietățile antigenice ale cardiolipinei, o haptenă utilizată în reacția Wasserman, reacție princeps în diagnosticul serologic al sifilisului. Cardiolipina, destul de răspândită în țesutul animalelor, plantelor sau chiar celulelor bacteriene, reacționează pozitiv numai cu anticorpii oamenilor



infecțati cu *Treponema pallidum*. Lipidele conferă proprietăți antigenice și funcționale lipopolizaharidelor (LPS), endotoxinelor germenilor Gram-negativi etc.

## ACIZII NUCLEICI

Acizii dezoxiribonucleici (ADN) și ribonucleici (ARN) sunt macromolecule slab imunogene în mod obișnuit, dar pot induce sinteza de anticorpi atunci când formează complexe cu unele polizaharide sau proteine. Dovada imunogenității lor este dată de existența anticorpilor anti- ADN mono- sau dublucatenar, în lupusul eritematos sistemic uman sau murin, boală caracterizată printr-o hiperproducție de anticorpi față de diverse antigene celulare proprii.

## LIPOPOLIZAHARIDELE

Lipopolizaharidele (LPS) sunt complexe macromoleculare din componența peretelui celular al germenilor Gram-negativi, alcătuite din fosfolipide și polizaharide. Complexul se leagă de structura rigidă a peretelui bacterian prin lipidul A, care la rândul său leagă un segment CORE format din L-glicero-D-Mano-Heptoză (HEP) și acidul ceto-3-deoxi-D-monoacetic (KDO) fosforilat (fig.8). În acest complex, lipidul A este regiunea care conferă proprietăți endotoxice și biologice moleculei, dintre care cele mai cunoscute sunt toxicitatea, pirogenitatea, proprietatea de activator policlinal pentru limfocitele B de șoarece, de stimulator al funcțiilor macrofagelor etc., fiind în general responsabil de activarea sau supresia unor funcții imune. Ca și în cazul altor antigene și în cazul LPS au fost semnalate susceptibilități diferite, condiționate de specia sau de caracterul genetic al animalelor inoculate. De exemplu, limfocitele șoarecilor CH3/HeJ nu reacționează *in vitro* la stimuli cu LPS, deoarece sunt lipsite de receptori pentru acest complex molecular. Limfocitele B ale celorlalte tulpini de șoarece au receptori pentru LPS și proliferază policlinal *in vitro* sub acțiunea acestuia.

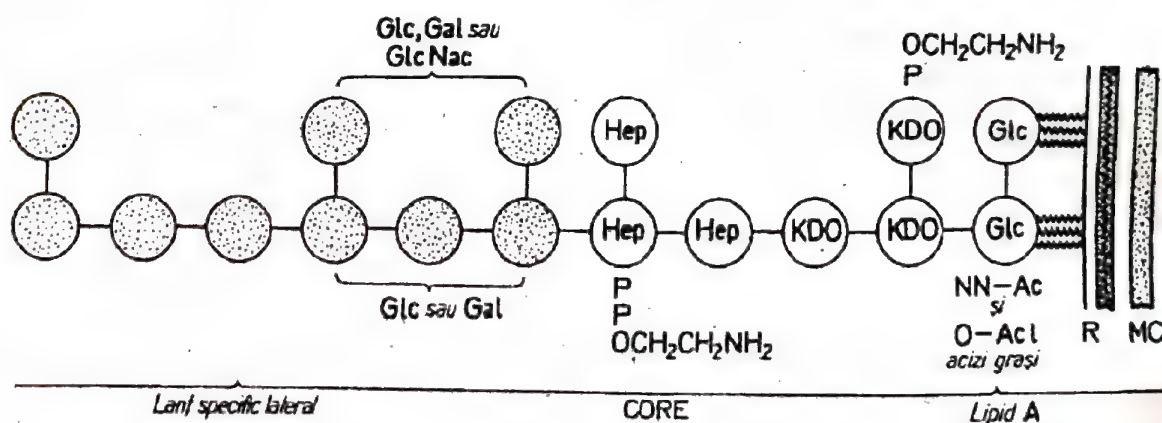


Fig.8, Structura chimică a unei molecule de lipopolizaharid bacterian (LPS). Lipidul A leagă, la structura rigidă (R) de la exteriorul membranei celulare (MC) a germenilor Gram-negativi, complexul glucidic CORE format din molecule de glucoză (Glc), galactoză (Gal) sau N-acetilgalactozamină sau N-acetil glucozamină (Gal-Nac sau Glc-Nac) și lanțul lateral la nivelul căruia se găsește antigenul polizaharidic.



## LECTINELE

Sunt antigene ubicuitare, prezente la animale, bacterii și în special la plante. Sunt proteine sau glicoproteine care leagă diferite molecule de hidrați de carbon (tabelul 5), specificitatea lor pentru aceste molecule făcând din ele instrumente larg utilizate în cercetările de imunochimie și imunologie celulară, cu referire specială la studiul glicoconjugatelor de pe membrana limfocitelor.

Tabelul 5

Specificitatea pentru hidrații de carbon a unor lectine

Sursa lectinei și denumirea ei	Denumirea comercială	Termen prescurtat	Specificitatea pentru HdC
<b>Plante</b>			
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phytohaemagglutinin	PHA	D-GalNac
<i>Phytolacca americana</i>	Pokeweed mitogen	PWM	D-GalNac
<i>Canavalia ensiformis</i>	Concavalina A	ConA	D-Man; D-Glc
<i>Lens culinaris</i>	Lentil lectin	LC	Man; Glc
<i>Arachis hypogaea</i>	Peanut agglutinin	PNA	Gal; GalNac
<i>Ricinus communis</i>	Castor bean	RCA2	GalNac
<i>Vicia villosa</i>	Vicia villosa lectin	-	D-GalNac
<i>Glycine maxima</i>	Soybean germ agglutinin	SGA	D-GalNac
<i>Triticum vulgaris</i>	Wheat germ agglutinin	WGA	GalNac; D-GalNac
<b>Animale</b>			
<i>Helix pomatia</i>	Helix pomatia agglutinin	-	D-GalNac
<i>Limulus polyphemus</i>	Horseshoe crab	-	NANA
<b>Bacterii</b>			
<i>Escherichia coli</i>	-	-	Man
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	Man
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	Gal

Gal=galactoză; GalNac=N-acetil galactozamină; Glc=glucoză; GlcNac=N-acetil glucozamină; HdC=hidrați de carbon; NANA=acid N-acetil neuraminic; Man=manoză.

Asupra limfocitelor exercită diferite efecte, ca de pildă leucoaglutinare, blastogeneză, stimularea eliberării unor mediatori sau proteine efectoare etc, acestea având la nivelul membranei cca.  $10^6 - 10^7$  receptori pentru diferite lectine. Prezența acestor receptori și recunoașterea diferențiată a diferitelor tipuri de celule, permite separarea și studierea unor populații ale sistemului imun. De exemplu, se pot separa monocitele de limfocite prin aglutinarea cu *peanut agglutinin* (PNA), o lectină extrasă din arahide, sau eritrocitele de șoarece de limfocite, prin aglutinare cu concanavalină (ConA) etc. Unele lectine aglutinează selectiv celulele tumorale, cum ar fi RCA, RNA, WGA, LA etc, fiind folosite ca markeri pentru acestea.

Capacitatea diferită de legare la celulele tumorale s-ar datora unei creșteri a numărului de situsuri de legare pe membrana acestora, modificării mobilității



acestor situsuri sau unor modificări morfologice ale membranei, care evidențiază hidratarea de carbon de la nivelul dublului strat lipidic al ei. Fixarea lectinelor la receptorii celulari este un proces energo-dependent solicitând anumite condiții de temperatură și este urmată, în cazul celor cu potențial de stimulare a blastogenezei, de mitoză și proliferare celulară policlonală. Datorită greutății moleculare mari (fitohemaglutina are de exemplu 140 kD), lectinele sunt în general bune imunogene.

#### ANTIGENE TIMO-DEPENDENTE ȘI TIMO-INDEPENDENTE

Antigenele timo-dependente sunt larg răspândite în natură și solicită, în cazul celor timo-dependente, participarea limfocitelor *T* ajutatoare pentru a putea stimula celelalte celule (limfocitele *B*). De regulă, sunt molecule nepolimerizate deosebindu-se de antigenele timo-independente care nu necesită participarea limfocitelor *T*, sunt molecule polimerizate și au numeroase grupări determinate care se succedă repetitiv, monoton, pe suprafața lor și care nu necesită participarea limfocitelor *T* la declanșarea răspunsului imun. Se cunosc puține antigene timo-independente (polivinil pirolidona, flagelina polimerizată, dextranul, endotoxinele germenilor Gram-negativi, polizaharizii pneumococici), cvasitotalitatea antigenelor din natură fiind timo-dependente.

#### ANTIGENE DE TIP I, II ȘI III

După modul cum sunt prelucrate după fagocitarea lor de către celulele prezentatoare de antigen (APC) antigenele pot fi de tip I, care nu suferă nici o modificare a moleculei, de tip II – la care este suficientă o simplă desfășurare a structurilor secundare sau terțiare a moleculei pentru a se evidenția epitopii – și de tip III care necesită fragmentarea, ruperea moleculei în bucăți, cu expunerea la suprafața fragmentelor a epitopilor. Figura 9 redă schematic aceste trei tipuri de antigene.

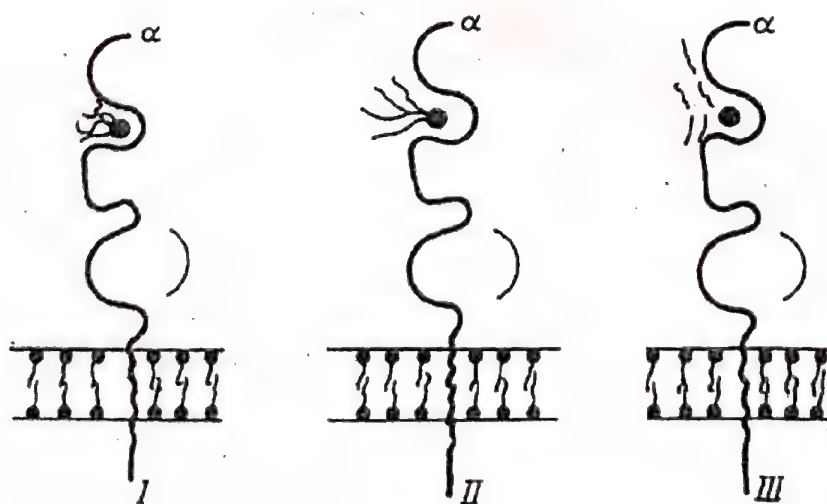


Fig.9. Clasificarea antigenelor după modul lor de "prelucrare" de către celulele fagocitare: antigenele de tip I nu sunt prelucrate, fiind exprimate ca atare pe lanțul  $\alpha$  al MHC de pe celula prezentatoare de antigen; antigenele de clasa II sunt "desfășurate", iar cele de clasa III sunt fragmentate de către celula fagocitară.



Sursa majoră de antigene, care dețin un rol deosebit în reacțiile imune, respectiv în declanșarea lor, sunt organismele vii: virusuri, bacterii, nevertebrate, vertebrate. Ele au rol atât în realizarea protecției antiinfecțioase sau antiparazitare, cât și în imunitatea de transplantare sau antineoplazică.

### Antigenele bacteriene și virale

Celulele prokariote (virusurile și bacteriile) conțin numeroase antigene care diferă între ele nu numai din punct de vedere al localizării lor sau al compoziției chimice, dar și din punct de vedere al imunogenității. În alcătuirea lor există proteine, glicoproteine, glicolipide, lipopolizaharizi, acizi nucleici, care au specificitate de specie sau specificitate de grup. Antigenele bacteriene diferă și din punct de vedere al greutății lor moleculare. De exemplu, greutatea moleculară a proteinei virusului mozaicului tutunului este de 17000 kD, enormă în comparație cu alte proteine sau nucleoproteine. O importanță particulară atât pentru patogenitatea cât și pentru antigenitatea microorganismelor o au polizaharizii și lipopolizaharizii existenți predominant în capsula și peretele celular al majorității speciilor bacteriene.

În comparație cu proteinele, polizaharizii sunt mai puțin antigenici atât pentru om, cât și pentru iepure și cobai, iar diferențele de antigenitate a lor, în funcție de specia bacteriană și de proveniență sunt mai mici decât cele existente la proteine. Așa s-ar explica reacțiile încrucișate între polizaharizii proveniți de la specii bacteriene îndepărtate.

Polizaharizii majorității formelor S ale germenilor Gram-pozitivi, sunt solubili și reacționează cu antiserurile dar nu sunt toxici și au slabe proprietăți antigenice. Cei ai speciilor Gram-negative sunt bogăți în fosfolipidele existente pe suprafața membranei celulare interioare (deci cea către citoplasmă) nu sunt atât de solubili, sunt toxici și au proprietăți antigenice. Unele specii bacteriene au în compoziția lor poliozide, polimeri ai glucidelor cu o specificitate antigenică mai limitată.

### Unele antigene specifice celulelor umane

Organismul uman conține un număr foarte mare de antigene care-i condiționează specificitatea de specie, de grup sau de individ. Dintre acestea, mai importante din punct de vedere teoretic și practic și, ca atare, mai bine cunoscute sunt antigenele *eritrocitare*, *leucocitare* și *tisulare*.

#### Antigenele eritrocitare

Pot fi împărțite în trei mari grupe:

- a) antigene heterofile care, în afară de om, se găsesc și la alte specii de animale;
- b) antigene de specie, comune tuturor oamenilor, și
- c) antigene de grup sau aloantigene, specifice unor grupuri de oameni și absente la alte grupuri.

Dintre antigenele eritrocitare, mai importante sunt cele ale sistemului ABO, Rh, MN, Kell-Cellano și Lewis.

**Antigenele sistemului ABO** au fost menționate pentru prima dată de către K. Landsteiner în anul 1900. Acesta a constatat că pe suprafața eritrocitelor există două antigene diferite pe care le-a denumit aglutinogenele A și B iar în ser există anticorpi naturali anti- aceste aglutinogene, pe care le-a denumit aglutininele  $\alpha$  și  $\beta$ . Un individ nu poate avea aglutinogenul A și aglutinina  $\alpha$  sau aglutinogenul B și aglutinina  $\beta$ , deoarece aglutinogenele A sau B ar fi aglutinate de aglutininele



respective, situație incompatibilă cu viața. Ca atare, oamenii care au aglutinogenul A, au în ser aglutininele  $\beta$ , iar cei care au aglutinogenul B, au aglutininele  $\alpha$ , relația fiind  $A\beta$  și  $B\alpha$ .

K. Landsteiner a constatat că populația umană poate fi împărțită în trei grupe distincte: grupa 0, lipsită de aglutinogenele A și B dar posedând aglutininele  $\alpha$  și  $\beta$ , cunoscută și sub denumirea de grupa "donatorilor universali" deoarece pot dona sânge indivizilor aparținând tuturor celorlalte grupe, dar nu pot primi sânge decât de la cei care aparțin grupei 0; grupa A cu aglutinogenul A și aglutinina  $\beta$  și grupa B cu aglutinogenul B și aglutinina  $\alpha$ . Ulterior, a fost descoperită și existența celei de-a IV-a grupe, cu indivizi care au aglutinogenele A și B dar nu au aglutinine. A fost denumită grupa AB sau grupa "receptorilor universali" care pot primi sângele de la indivizii tuturor grupelor, deoarece lipsa aglutininelor proprii permite acest lucru. Deci, oamenii aparțin din punct de vedere al sistemului ABO grupelor  $O\alpha\beta$ ,  $A\beta$ ,  $B\alpha$  și  $AB0$  sau, după unele notații, 0 I, A II, B III, AB IV.

După cum spuneam, grupa 0 I, lipsită de aglutinogenii A și B, are numai aglutininele  $\alpha$  și  $\beta$ , fiind donator universal, iar grupa AB IV, lipsită de izoaglutininele  $\alpha$  și  $\beta$ , are ambele aglutinogene, fiind receptori universali. În realitate, hematiile din grupa 0 sunt aglutinate de serul anumitor indivizi din grupele A și AB, precum și de extractele saline ale semințelor de *Ulex europeus*, sau de unele seruri imune anti-diferite tulpini de *Shigella*. Faptul demonstrează că aceste hematii posedă unele antigene heterofile.

Transfuzia sângelui este posibilă numai în cadrul aceleiași grupe, cu excepția grupei 0 care "poate dona tuturor", și a grupei AB, care poate "primi de la toți". Transfuzia eronată de sânge de la o grupă la alta incompatibilă poate fi fatală pentru receptor, deoarece aglutininele proprii vor aglutina hematiile transfuzate, aglutinare urmată de obturarea vaselor sangvine și moarte.

Grupa AB IV, deci a receptorilor universali, o dată cu aglutinogenele A sau B primite de la donatorii de sânge, primește și aglutininele acestor donatori, care-i vor aglutina propriile hematii. Dar această aglutinare este foarte slabă, fără efecte clinice vizibile, deoarece cantitatea de aglutinine transfuzată este foarte mică, încât coagulii formați nu pot influența semnificativ organismul receptorului.

Aglutinogenele sistemului ABO se transmit ereditar, fiind sub controlul genelor A și B cu trei alele (A, B, 0), șase genotipuri (AA, A0, BB, B0, 00 și AB), și patru fenotipuri (A, B, 0, AB).

Grupa 0 este întotdeauna hemozigotă (00) iar grupa IV heterozigotă (AB), astfel că din părinți 00 se vor naște copii aparținând predominant grupei 0, iar din cei cu grupele A II, B III, sau AB se vor naște descendenți aparținând tuturor celor patru grupe, prezența variantelor heterozigote A0, B0, sau AB, permițând și exprimarea fenotipului 0 (tabelul 6).

Aglutinogenul A este alcătuit din punct de vedere antigenic din mai multe subgrupe ( $A_1, A_2, A_3, A_4 \dots A_x$ ), dintre care unele îl exprimă mai bine iar altele mai slab, astfel că pot crea unele dificultăți de interceptare a reacțiilor *in vitro*. De exemplu, subgrupa  $A_1$  exprimă mai bine aglutinogenul decât restul subgrupelor.

Antigenele sistemului ABO nu suferă modificări, menținându-se neschimbate pe toată durata vieții individului. Este posibilă o eventuală scădere a aglutininelor către bătrânețe, dar fără importanță practică majoră.

La un număr foarte mic de indivizi, lipsesc atât aglutininele, cât și aglutinogenele. Ei aparțin grupului "OH" sau tipului "Bombay" și ar fi expresia fenotipică a represiei genelor care controlează sinteza sistemului ABO. Descendenții lor se comportă normal din acest punct de vedere, moștenind probabil caracterul celuilalt părinte. Din punct de vedere chimic, aglutinogenele A și B sunt glicoproteine cu greutate moleculară mare, (200-1000 kD), care conțin cca. 80% hidrați de carbon și 15-20% proteine. Hidrații de carbon sunt bogați în L-fructoză, D-galactoză, D-glucozamină, D-galactozamină etc, participând la conferirea specificității lor antigenice.



Variabilitatea de combinare a produselor genelor care determină grupele sanguine ale sistemului ABO

Genotipul	AA x AA	AA x AO	AO x BO	AB x OO
Combinatii posibile	$A \rightarrow A = AA$ $A \rightarrow A = AA$ $A \rightarrow A = AA$ $A \rightarrow A = AA$	$A \rightarrow A = AA$ $A \rightarrow A = AA$ $A \rightarrow O = AO$ $A \rightarrow O = AO$	$A \rightarrow B = AB$ $A \rightarrow B = AB$ $A \rightarrow O = BO$ $A \rightarrow O = BO$	$A \rightarrow O = AO$ $B \rightarrow O = BO$ $B \rightarrow O = BO$ $B \rightarrow O = BO$
Fenotipul descendenților	A = 100%	A = 100%	A = 25% AB = 25% B = 25% O = 25%	A = 50% B = 50%

Notă: În combinațiile AO sau BO, caracterul O este întotdeauna recesiv.

În afară de hematii, aceste antigene sunt exprimate și pe leucocite, trombocite, spermatozoizi, ca și pe diferite alte țesuturi, cum ar fi de pildă mucoasa gastrică, dar nu pe piele, placenta, cristalin etc. Se găsesc în lacrimi și urină, dar nu în lichidul cefalorahidian.

Antigenele sistemului ABO nu sunt localizate numai pe suprafața celulelor și țesuturilor. Se găsesc și sub formă solubilă, atât cele fixe cât și cele solubile, fiind identice din punct de vedere antigenic dar deosebindu-se prin solubilitatea lor: cele din umori sunt solubile în apă, iar cele fixe sunt solubile în alcool. În umori, a fost semnalată existența unui antigen particular, antigenul H, considerându-se că există sistemul ABO cu aglutinogenele AB și sistemele ABH în care, pe lângă aglutinogenele A și B, mai există și aglutinogenul H. Aceste diferențe individuale se pare că ar fi realizate de către două gene alele (Se și se) care conferă calitatea de "secretor" (Se) și "nesecretor" (se) acestor aglutinine.

Este interesantă distribuția pe Glob a fenotipurilor ABO. Astfel, dintre albi, 44% sunt grupe A, 40% grupa O, 12% grupa B și numai 4% aparțin grupei AB. Grupa O este comună la indienii din America de Nord și de Sud și mai rar întâlnită la europeni și asiatici, unde reprezintă cca. 27-37% în comparație cu 75-98% cât se înregistrează la indienii din SUA și Argentina. În Europa și Australia, precum și la albi din America proveniți din europeni, grupa A este predominantă (50-60%), pe când la locuitorii Asiei sau la persoanele de origine asiatică, cum este cazul ungurilor și bulgarilor din Europa, predomină grupa B (39%) care este însă, foarte rară la indienii din SUA și Argentina, la eschimoși și la aborigenii din Australia. Grupa AB, deși rară, se găsește totuși într-un procent relativ mare (10%) la egipteni și chinezi și foarte scăzut la hinduși.

**Sistemul Rh.** K. LANDSTEINER și A. S. WIENER semnalau în anul 1940 faptul că serul iepurilor imunizați cu eritrocitele maimuței *Macaccus rhesus* aglutinează eritrocitele a 85% din oameni. Inițial s-a descoperit existența unui antigen comun maimuțelor și oamenilor numit "antigenul D", dar ulterior s-a descoperit existența altor antigene (C, c D, E, e), controlate de șase gene organizate în trei perechi de alele și anume: Cc, Dd, și Ee. S-a dovedit că antigenele d și e sunt foarte rare, fiind lipsite de importanță practică, deosebindu-se din acest punct de vedere de



antigenele *C*, *c*, *D*, *E* și *e*. Cu ajutorul antiserurilor au putut fi identificate 12 tipuri de Rh (tabelul 7). Combinațiile cele mai frecvente în populația umană sunt *CDe* (53,20%), *CDE* (15,85%), *CDE* (14,58%) și *cde* (12,36%).

Tabelul 7

Grupele antigenice Rh și identificarea lor cu seruri imune anti-Rh

Grupa antigenică anti - Rh	Modul de reacție cu serul imun anti-			
	C	D	E	c
<i>cde</i>	0	0	0	+
<i>cdE</i>	0	0	+	+
<i>cDe</i>	0	+	0	+
<i>cDE</i>	0	+	+	+
<i>Cde/c</i>	+	0	0	+
<i>CdE/c</i>	+	0	+	+
<i>CDe/c</i>	+	+	0	+
<i>CDE/c</i>	+	+	+	+
<i>Cde/C</i>	+	0	0	0
<i>CdE/C</i>	+	0	+	0
<i>CDe/C</i>	+	+	0	0
<i>CDE/C</i>	+	+	+	0

Pe un cromozom poate exista câte un membru al fiecărei perechi de alele, într-un locus fiind doar una dintre cele două alele ale unei perechi, locusul respectiv putând fi deci ocupat alternativ de către una sau alta dintre cele două alele specifice. De exemplu, *C* poate înlocui pe *c*, *E*, pe *e*, și *D* pe *d*. Antigenul *d* din grupa alelică *Dd* nu a fost pus încă în evidență, fenotipul *D* fiind reprezentat numai prin calitatea *D*, deoarece fenotipul *d* este recesiv. De altfel, fenotipul *D* presupune existența a două genotipuri, unul *DD* hemozigot și altul *Dd* heterozigot. Imunologic însă ele sunt *D* (*Rh*<sup>+</sup>), hematiile și unora și altora aglutinând cu serurile anti *D* (*Rh*<sup>+</sup>). Acest fenotip este cel mai antigenic, fiind de altfel principalul responsabil de reacțiile hemolitice post transfuzionale, antigenele *C* și *E* fiind mai slab antigenice și mai puțin implicate în generarea hemolizei.

În afară de aceste antigene majore, a mai fost descoperită existența unor antigene rare, denumite *C*<sup>w</sup>, *C*<sup>x</sup>, *E*<sup>w</sup>, *C*<sup>u</sup>, *c*<sup>w</sup>, *c*<sup>v</sup>, *D*<sup>v</sup>, *E*<sup>u</sup>, *f*, *v* etc.

Deci, există mai mult de șase fenotipuri ale sistemului Rh rezultate din cele trei perechi alelice obișnuite, posibilitățile de alelism ale genelor care ocupă acest locus fiind mult mai numeroase. De exemplu, posibilitatea de alelism a alelelor obișnuite *C* și *c* este *CCcc* și *Cc* care însă se dublează de la trei la șase dacă se ia în considerație intervenția altei alele, să zicem *D*, deoarece se mai adaugă *CC*<sup>w</sup>, *C*<sup>w</sup>, *c*<sup>w</sup> și *C*<sup>w</sup><sub>c</sub> astfel că alelismul sporește cu fiecare nouă genă care poate ocupa locusul respectiv.

Ținând cont de toate acestea, teoretic ar exista posibilitatea existenței a mai mult de 290 de combinații liniare ale cromozomilor și a peste 42 000 de genotipuri.



Antigenele sistemului  $Rh^+$  sunt transmisibile ereditar și sunt responsabile de eritroblastoză fetală. Astfel, o mamă  $Rh^-$  care poartă un fătus  $Rh^+$  având acest caracter moștenit de la tată, va fi imunizată de hematiile fetale, anticorpii anti- $Rh$  apărând producând aglutinarea eritrocitelor fetale și moartea produsului de concepție.

Spre deosebire de aglutininele  $\alpha\beta$  ale sistemului ABO, în sistemul  $Rh$  nu există anticorpi naturali, ei apărând după imunizarea mamei de către hematiile fetale, sau după transfuzii cu eritrocitele subiecților  $D (Rh^+)$  la cei  $D (Rh^-)$ .

**Antigene specifice de grup sanguin, cu importanță minoră în reacțiile posttransfuzionale.** Pe lângă antigenele sistemului ABO și  $Rh$ , care sunt puternic imunogene și au implicații majore în transfuzie și sarcină, există și alte sisteme antigenice care nu au valoare practică dar care, dat fiind că reprezintă expresii fenotipice ale genotipului individual, pot fi utile în medicina legală sau în cercetările antropologice. Dintre acestea, ar fi sistemele MN, LEWIS, KELL - CELLANO, LUTHERAN etc.

**Sistemul MN.** Încă din anul 1927, K. Landsteiner și P. Levine semnalează existența factorilor  $M$  și  $N$ . Aceștia sunt alelomorfi (ocupă un locus echivalent pe cromozomul pereche omolog) și sunt lipsiți de importanță pentru transfuzii, subiecții  $M^-$  și  $N^-$  putând primi hematiile celor  $M^+$  sau  $N^+$  fără a se imuniza împotriva lor. Aceste antigene sunt termorezistente, putând fi obținute antiseruri prin imunizarea iepurilor cu eritrocite umane fierte. Prin absorbția ulterioară a acestor antiseruri, au fost obținuți anticorpi anti- $M$  și anti- $N$  cu ajutorul cărora a fost pusă în evidență existența homozigotiei și heterozigotiei la nivelul acestui sistem, hematiile unor indivizi aglutinând numai cu serurile anti- $M$  sau numai cu cele anti- $N$ , fiind deci de genotip  $MM$  sau  $NN$ , iar al altora, atât cu serurile anti- $M$  cât și cu cele anti- $N$ , fiind heterozigoți  $MN$ . În sistemul  $MN$  sunt unele antigene rare, ca de pildă  $M_2$  sau  $N_2$ , din care cauză pot exista indivizi  $MN_2$ ,  $M_2N$ ,  $M_2N_2$  etc. Acest gen de variante antigenice are importanță în stabilirea paternității, în cercetări genetice referitoare la transmiterea ereditară a unor caractere etc.

În anul 1947 a fost descoperită existența unei gene  $S$  și a alelei sale  $s$ , strâns legată de genele  $MN$  cu care formează grupe ligaturale genice, cu posibilitatea de realizare sporită a unor fenotipuri și genotipuri, de interes pentru studiile antropologice și în special pentru cele de medicină legală, deoarece produsele acestor gene sporesc șansele de precizare a paternității.

**Sistemul Kell - Cellano** este format din factorii  $K$  (Kell) și  $k$  (Cellano), descendenți din două gene autosomale, fără dominanță și recesivitate una față de alta, putând fi exprimate fenotipic prin antigene corespunzătoare, conform situației redate în tabelul 8.

Tabelul 8

Genotipul și fenotipul sistemului Kell-Cellano și relația lui serologică

Genotip	Fenotip	Comportament serologic
$KK$	$K^+$	- Pozitiv anti-Kell - Negativ anti-Cellano
$Kk$	$K^+k^+$	- Pozitiv anti-Kell - Pozitiv anti-Cellano
$kk$	$k^+$	- Negativ anti-Kell - Pozitiv anti-Cellano



Genele care controlează sinteza celor două antigene sunt *antitetice*, adică, atunci când lipsește un antigen este prezent celălalt, cele două antigene putând coexista și în sistem heterolog dar într-un procent foarte mic.

De aceea, antigenele *K* au o frecvență extrem de redusă, (cca. 1,2%), iar cele *k*, o frecvență mare (cca. 99,8%), heterozigoții *Kk* reprezentând cca. 1% din populație.

Mai imunogen este antigenul *K*, o proteină sensibilă la acțiunea enzimelor proteolitice. El poate fi, ca și antigenul *Rh*, responsabil de complicații posttransfuzionale și de boala hemolitică a nou-născutului (eritroblastoză fetală), dar frecvența sa foarte redusă în populație face improbabilă implicația sa majoră în aceste forme de patologie imună.

*Sistemul Lewis* a fost descoperit în anul 1946, când s-a constatat că serul unei femei din Anglia, cu numele Lewis, putea aglutina hematiile a cca. 25% din populația acestei țări, fără nici o relație cu sistemul *ABO*. De aici concluzia că în serul femeii Lewis erau anticorpi naturali care aglutinau hematiile ce purtau pe suprafața lor niște antigene necunoscute până atunci și care existau la un sfert din populație. Pe această bază, oamenii au fost împărțiți în două grupe: Lewis-pozitivi sau *Le* ( $a^+$ ) și Lewis-negativi sau *Le* ( $a^-$ ). Factorul *Le* ( $a^+$ ) se transmite recesiv, din părinți *Le* ( $a^-$ ) putându-se naște copii *Le* ( $a^+$ ), a cărei frecvență este mai mare în primele luni după naștere, pentru ca să scadă apoi în primii ani de viață. În afară de eritrocite, aglutinogenele *Le* ( $a^+$ ) sunt prezente și în salivă, dar această prezență nu este în relație cu fenotipul existent la nivelul eritrocitelor, deoarece cca. 90% din indivizi au antigenul *Le* în salivă dar nu și la nivelul eritrocitelor, adică sunt *Le* ( $a^+$ ) pentru salivă și *Le* ( $a^-$ ) pentru hematii.

Există o mare interdependență între sistemul Lewis și antigenele *ABH*, indivizii *Le* ( $a^+$ ) având fenotipul "Bombay" și fiind "nesecretori" de aglutinogene *ABH*, iar cei *Le* ( $a^-$ ) fiind "secretori" *ABH*.

Acest sistem este încă puțin cunoscut atât din punct de vedere al compoziției chimice a antigenelor, cât și din cel al genelor care controlează sinteza acestor antigene.

*Antigenele Lutheran* sunt controlate de gene localizate pe același cromozom cu alte gene care sunt responsabile de caracterul fenotipic "secretor" (*Ss*) și "nesecretor" (*ss*) al antigenelor *ABO* și *ABH*.

Există două alele,  $Lu^a$  și  $Lu^b$ , prima fiind dominantă și responsabilă de exprimarea antigenului *Lu* ( $a^+$ ), iar cea de-a doua, recesivă. Antigenul *Lu* este exprimat atât în hemozigoție  $Lu^aLu^a$ , cât și în heterozigoție ( $Lu^aLu^b$ ), în ambele situații indivizii fiind *Lu* ( $a^+$ ), în timp ce în homozigoția  $Lu^bLu^b$  sunt *Lu* ( $a^-$ ).

În afară de aceste sisteme antigenice, la om sunt cunoscute multe altele, importante mai mult pentru genetică și mai puțin pentru imunologie. Este cazul sistemelor *Kidd*, *Duffy*, *Vel*, *Ven*, *Hunter*, *Levy*, *Jobbins* etc., existente la indivizi aparținând unor rase umane diferite sau la cei care prezintă anumite stări patologice. Ca și în cazul celor descrise anterior, antigenele acestor sisteme au fost descoperite prin complexe studii serologice, efectuate atât pe indivizi separați, cât și pe grupe de indivizi.

### Antigenele leucocitare și tisulare

În afară de antigenele exprimate pe suprafața hematiilor, există antigene exprimate pe limfocite, macrofage, trombocite, granulocite, sau pe suprafața diferitelor celule ale organelor și țesuturilor. Ele sunt responsabile de specificitatea de specie, de organ, de grup, sau sunt caracteristice fiecărui individ din cadrul unei specii date (vezi capitolele "Complexul Major de Histocompatibilitate" și "Markerii antigenici"). Datorită unora dintre acestea, se realizează rejecția de grefe alogene, incompatibilitatea între diferite organisme, recunoașterea antigenelor străine de organism, cooperările celulare etc.

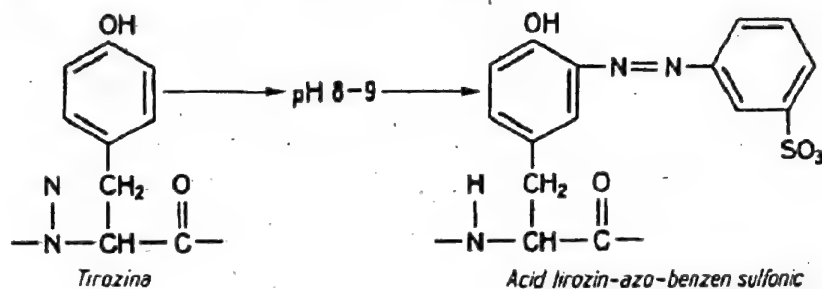


## ANTIGENE ARTIFICIALE

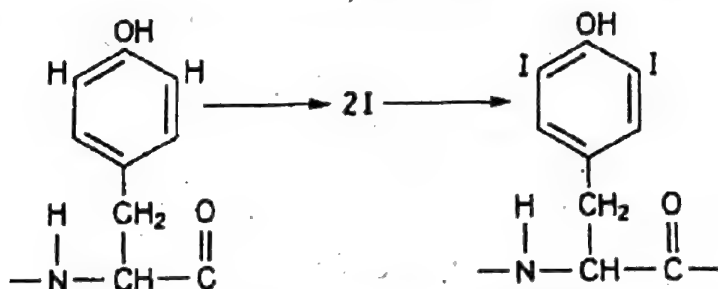
La elucidarea unor probleme legate de compoziția chimică și funcția antigenelor, un aport remarcabil au avut tehnologiile de obținere a antigenelor artificiale și sintetice, realizate în primul caz prin cuplarea de proteine la diverse grupări chimice cu greutatea moleculară mică, iar în cel de al doilea caz, prin polimerizarea unui singur aminoacid, sau a mai multor aminoacizi, care permit obținerea de homo- sau heteropolimeri.

Antigenele artificiale se pot obține prin legarea proteinelor între ele la diferite grupări chimice cu greutatea moleculară mică. Se realizează conjugarea proteinelor la alte proteine, la haptene, sau la diverse suporturi insolubile prin reacții de diazotare, iodurare, dinitrofenilare etc.

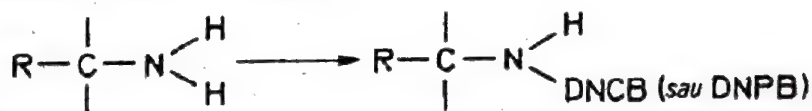
Prin diazotare se obține "azoproteina". Inițial se realizează o transformare a haptenei într-o sare diazo- după care este cuplată la un rest de tirozină, histidină, lizină etc., din componența unei proteine conform reacției:



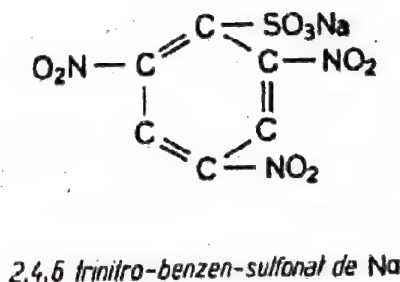
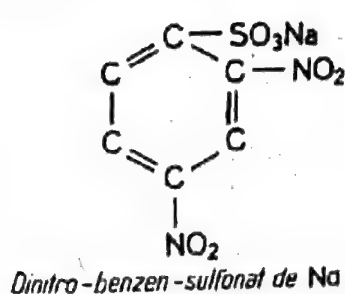
Prin iodurare se realizează substituirea unor  $\text{H}^+$  din moleculă, cu ioni  $\text{I}^+$ :



Prin reacția de dinitrofenilare se realizează substituirea unor atomi de H din gruparea  $\text{NH}_2$  cu haptene de genul DNPB (dinitrofluorbenzen) sau DNCB (dinitroclorbenzen) după modelul:

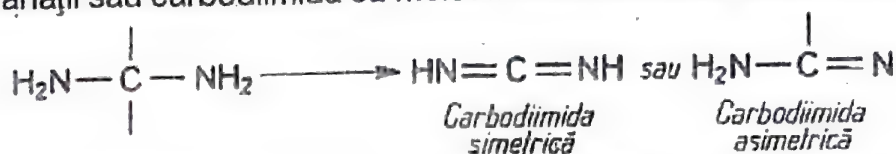


De regulă, se folosesc mult haptenele dinitro-benzen-sulfonat de sodiu, sau 2, 4, 6-trinitro-benzen-sulfonatul de sodiu.



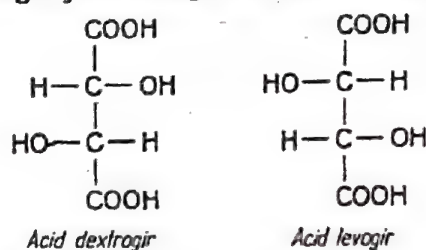


Conjugările proteină + proteină se realizează cu ajutorul unor agenți de bază ca diizocianații sau carbodiimida cu molecula simetrică sau asimetrică.



Prin aceste tratamente proteinele își pierd specificitatea de specie, căpătând specificități antigenice noi. De exemplu, anticorpii obținuți prin imunizarea iepurilor cu albumină bovină iodată vor reacționa slab cu albumina bovină normală, dar vor da reacții de precipitare puternice cu albumina iodată, indiferent de specia de la care provine.

Cu ajutorul antigenelor artificiale s-a putut preciza responsabilitatea haptenei în conferirea specificității antigenice, în reacția haptene-anticorp importantă fiind configurația și nu natura sa chimică. De exemplu, deși au aceeași structură chimică, acidul tartric levogir și dextrogir au specificități antigenice distincte.



S-a mai putut stabili importanța grupărilor carboxil ( $-\text{COO}^-$ ), sulfonat ( $\text{SO}_3^-$ ), arseniat ( $\text{As HO}_3^-$ ) etc. în determinarea antigenicității haptelenelor.

## ANTIGENELE SINTETICE

Au fost obținute polipeptide sintetice liniare sau ramificate. Cele liniare au ca principali aminoacizi Lys, Glu, Tyr, Ala, înșiruiți într-un singur lanț, cu lungimi diferite, format din unul sau mai mulți aminoacizi. Polimeii ramificați sunt asamblați în mai multe etape prin adăugarea de lanțuri laterale la o structură liniară centrală care reprezintă un fel de "coloană vertebrală" a moleculei. Pot fi obținuți homopolimeri liniari sau ramificați, cu diferite greutatea moleculare, formați dintr-un singur aminoacid, sau heteropolimeri liniari sau ramificați formați din mai multe reziduuri de aminoacizi. De exemplu, în cazul celor ramificați "coloana vertebrală" poate fi formată dintr-un homopolimer liniar de lizină la care au fost atașate lanțurile laterale de Ala având ca reziduuri terminale Tyr, Glu etc. (fig. 10).

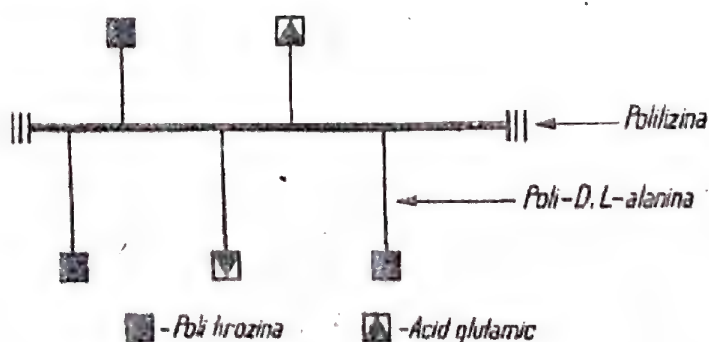


Fig.10. Heterodimer sintetic format dintr-o "coloană vertebrală" de poli-L-lizină la care sunt atașate lanțuri laterale alcătuite din alți aminoacizi (Tyr, Al, Glu).



Cu ajutorul antigenelor sintetice s-a putut stabili faptul că un singur aminoacid, chiar dacă este polimerizat în lanțuri lungi liniare sau ramificate, cu greutate moleculară mare, nu este imunogen. Pentru a deveni imunogen, este necesară polimerizarea a minimum trei aminoacizi diferiți.

Cu ajutorul polimerilor sintetici s-a reușit descifrarea unor probleme legate de genetica răspunsului imun. De exemplu, prin stimularea cobailor cu DNP-PLL (dinitrofenil-poly-L-lizină) s-a putut preciza că transmiterea caracterului de "reactant" (R) sau "nereactant" (NR) la descendenți se face conform legilor mendeleene. Gena responsabilă de caracterul R, adică de potențialul de declanșare a unui răspuns imun după stimulul cu DNP-PLL, este prezentă la tulpina 2 și absentă la tulpina 13.

De asemenea, tot cu ajutorul acestor polimeri a putut fi precizat rolul greutății moleculare a antigenului, cea mai mică moleculă de DNP-PLL susceptibilă de a induce răspuns imun fiind DNP cu 8 reziduuri de Lys. Se poate concluziona că antigenele sintetice au permis nu numai stabilirea unor legături privind condițiile antigenicității dar și descoperirea existenței genelor de "răspuns imun" (Ir), adică stabilirea rolului genetic în declanșarea acestui răspuns.

## REAȚII ANTIGENICE ÎNCRUCIȘATE

Există situații în care un antigen, de fapt un "mozaic" de antigene (A), are unul sau mai mulți epitopi dintre care unii se găsesc exprimați și pe alt mozaic de antigene (B).

Inocularea antigenului A va induce sinteza unei populații policlonale de molecule de anticorpi care vor reacționa specific cu epitopii respectivi existenți atât pe A cât și pe B (fig. 11). Bineînțeles, anticorpii anti-A vor reacționa mult mai intens cu A, deoarece vor recunoaște un număr mai mare de epitopi, iar cei anti-B, desigur, vor reacționa mai puternic cu B și mult mai slab cu A. Acest tip de reacție în care serul imun recunoaște epitopii existenți la nivelul a două sau mai multe molecule de antigen se numește *reacție antigenică încrucișată* sau *heterospecificitate*.

Reactivitatea este "parțială", deoarece în populația moleculelor de anticorpi numai o mică parte este activă, recunoscând specific un număr limitat de epitopi. Mai mult, paratopul (partea complementară a anticorpului care se fixează pe suprafața epitopului) reacționează la afinitate înaltă cu epitopul care i-a generat formarea și cu afinitate slabă cu același epitop aflat în "minoritate" pe altă moleculă de antigen.

Și în cazul "anticorpilor monoclonali", care "văd" prin definiție doar un singur epitop, există un oarecare grad de heterospecificitate. O explicație ar fi dată de posibilitatea ca într-o proteină de antigen A să existe un fragment peptidic liniar care să reprezinte doar o parte din epitopul discontinuu mai complex de la nivelul proteinei B. În acest caz, proteina liniară ar fi recunoscută mai slab de către anticorpul monoclonal anti-B, deoarece ar avea mai puține puncte de contact cu paratopul (fig.12). Așa s-ar explica de ce uneori anticorpii monoclonali pot reacționa nespecific cu antigene aparent neînrudite între ele.



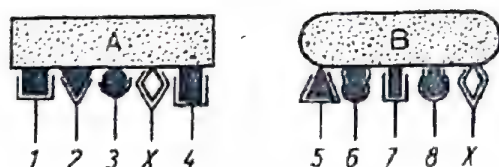


Fig.11. Explicația existenței reacțiilor imune încrucișate între antigene diferite. Grupările purtătoare ale antigenelor A și B au epitopi diferiți, cu o singură excepție, epitopul x care este prezent atât la A cât și la B. Anticorpii anti-x vor reacționa numai cu antigenul A (reacție puternică), dar și cu B (reacție slabă).

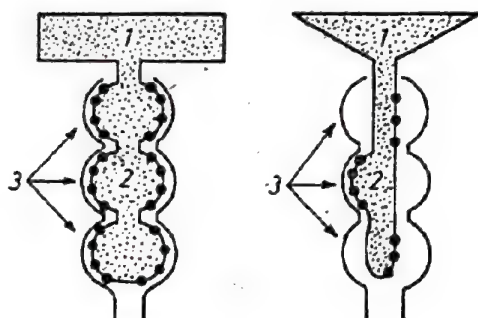


Fig.12. Explicație ipotetică a modului de reacție nespecifică a anticorpilor monoclonali. Un antigen, cu gruparea purtătoare 1 și epitopi 2, induce sinteza anticorpilor monoclonali. Alt antigen, cu gruparea purtătoare (1) diferită de cea a antigenului inductor, are în secvența sa câțiva determinanți antigenici similari celui folosit pentru obținerea anticorpilor monoclonali. Aceștia sunt suficienți pentru a fi recunoscuți de către situsul combinativ (3) al anticorpilor monoclonali specifici primului antigen.

după el posibilitatea de stimulare, de inducere a activării sistemului imun. Pentru realizarea competiției antigenice sunt necesare un anumit raport molecular între antigenul care inhibă și cel inhibat, precum și un anumit interval de timp în secvența inoculărilor. Inhibiția realizată prin antigenul competiționat ar putea fi explicată prin prezența moleculelor de anticorp cu afinitate mai mare pentru epitopi, prin generarea de către primul antigen a proliferării unor limfocite sau monocite cu funcții supresoare, care ar inhiba activarea altor clone de celule expuse unui stimul ulterior etc.

Cunoașterea mecanismelor care duc la competiție antigenică, în afară de interesul teoretic pe care-l prezintă, are și o mare importanță practică deoarece, pe baza acestor noțiuni, se pot folosi scheme de vaccinare fundamentate riguros științific. Aceasta, mai ales atunci când se practică imunizări multiple în scopul obținerii unor seruri imune sau când se asociază vaccinuri polivalente în vaccinările preventive.

## COMPETIȚIA ANTIGENICĂ

Competiția antigenică este o "inhibiție" a răspunsului imun față de un stimul antigenic, indusă de către alt stimul, atunci când un antigen este inoculat în anumite raporturi cu un alt antigen.

Competiția poate fi *intramoleculară*, *intermoleculară* sau *secvențială*. În cazul competiției intramoleculară, partea cea mai imunogenă a moleculei de antigen inhibă răspunsul imun față de partea mai puțin imunogenă. De exemplu, fragmentul Fc al moleculei de imunoglobulină este mai imunogen decât fragmentul Fab, deprimând răspunsul imun, respectiv sinteza de anticorpi anti-Fab. De aceea anticorpii anti-Fab se obțin mai greu decât cei anti-Fc care apar primii în cursul imunizării și la un titru mai ridicat.

Competiția intermoleculară are loc în cazul inoculării unor molecule diferite de antigen, unele dintre ele deprimând răspunsul față de altele. De exemplu, globulinele serice sunt mai bune imunogene competiționând cu albumina serică.

A treia formă de competiție este cea *secvențială* care, de altfel, este și cea mai importantă din punct de vedere practic, influențând de multe ori rezultatul vaccinațiilor. De obicei, primul antigen inoculat competiționează cu antigenele inoculate la anumite intervale de timp după el. Cu alte cuvinte, antigenul inoculat înaintea altor antigene le "blochează" celor venite



## VACCINURI

Imunologia a debutat ca o activitate practică, impunând mult mai târziu necesitatea explicării științifice a fenomenelor observate. Vaccinarea a fost prima utilizare practică a unor legi de bază ale imunologiei, cu mult înainte de a cunoaște mecanismele care stau la baza instalării protecției imune post-vaccinale. Primele vaccinuri folosite au fost cele formate din organisme vii, neatenuate (bacterii, virusuri), înlocuite apoi cu germeni omorâți sau atenuați prin cultivarea lor, fie în alte gazde decât cele naturale, fie în condiții precare de cultivare *in vitro*, care să le atenueze sau chiar să le elimine total potențialul patogen, menținându-l doar pe cel imunogen. În afară de antigenele corpusculare (bacterii, virusuri, țesuturi etc.), au fost și sunt folosite vaccinuri obținute din toxinele bacteriilor transformate în produse atoxice și imunizante (anatoxine), diverse alte molecule de glicoproteine, glicolipide etc. Toate acestea formează așa-zisele *vaccinuri convenționale*, care s-au dovedit în ultimul secol a fi instrumente indispensabile pentru combaterea și prevenirea unor boli infecțioase, cu răspândire endemică sau epidemică.

Dar vaccinurile convenționale, pe lângă valoarea lor imunizantă indiscutabilă, uneori pot avea efecte secundare negative. Câteodată pot genera accidente post-vaccinale, ca de pildă declanșarea unor reacții alergice sau de autoagresiune, pot fi greu de suportat de către organism datorită durerii de la locul de inoculare sau febrei pe care o provoacă sau pot, atunci când germeni sunt incorect atenuați, provoca boala naturală cu tot cortegiul ei de efecte dramatice. De asemenea, dat fiind că aceste vaccinuri sunt de fapt adevărate mozaicuri antigenice, competiționează între ele și, uneori, pe lângă componentele imunogene, pot conține și componente supresoare care să deprime nespecific reacțiile imune. Pentru evitarea acestor neajunsuri, a fost necesară obținerea de noi vaccinuri, bine definite și cunoscute, lipsite de efecte secundare nocive. Până în prezent, au fost parcurse diferite etape "istorice", fiecare constituind un pas înainte pe linia îmbunătățirii vaccinurilor (tabelul 9).

Tabelul 9

Diferite faze de ameliorare a vaccinurilor (după F.Y. LIEW)

Faza	Tipul de vaccin	Domeniile în care s-au realizat progrese
A	Convenționale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Imunizarea empirică antiinfecțioasă</li> <li>- Obținerea de vaccinuri vii, atenuate</li> <li>- Obținerea de vaccinuri omorâte</li> </ul>
B	Convenționale ameliorate	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Realizarea la scară industrială a culturilor de celule</li> <li>- Purificarea antigenelor</li> <li>- Dobândirea de cunoștințe privind baza genetică a virulenței</li> <li>- Dobândirea de cunoștințe teoretice în imunologie</li> </ul>
C	Proteine sintetice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Producerea anticorpilor monoclonali</li> <li>- Obținerea de antigene înalt purificate</li> <li>- Realizarea clonelor de gene și de secvențe de gene</li> <li>- Obținerea de adjuvanți îmbunătățiți</li> </ul>



Faza	Tipul de vaccin	Domeniile în care s-au realizat progrese
D	Peptide sintetice	- Imunochimia - Chimia computerizată - Înțelegerea mecanismelor de acțiune a adjuvanților
E	Peptide sintetice simple	- Chimia medicală - Acțiuni pe diferite sisteme
F	Vaccinuri orale	

În prezent există preocupări susținute pentru obținerea de vaccinuri moleculare, de unde și denumirea lor de *vaccinuri subunitare*. În acest scop, sunt folosite diferite tehnologii dintre care mai uzuale sunt: a) *tehnologia ADN-ului recombinat*; b) *vaccinurile subunitare introduse la purtători heterologi*; c) *realizarea de peptide sintetice* și d) *utilizarea de anticorpi anti-idiotip* care mimează conformația sterică a vaccinului natural.

**Tehnologia ADN-ului recombinat** constă din identificarea, izolarea și introducerea în plasmide sau alți purtători adecvați, prin "clonare genică", a unui material genetic nou și menținerea lui în bacterii, drojdii, celule animale etc, pentru un timp nedefinit. Prin această metodă se urmărește obținerea de vaccinuri antivirale, antibacteriene sau chiar antiparazitare. Primul vaccin comercial obținut astfel a fost vaccinul ETEC, contra tulpinilor enterotoxigene de *E. Coli* a purceilor, bazat pe următorul principiu: enterotoxina acestor bacterii conține toxine stabile termic (ST) și labile termic (LT). Cele ST sunt neimunogene iar cele LT, care sunt imunogene, sunt formate din două subunități dintre care una (A), toxigenă și neimunogenă, iar alta (B), netoxigenă și imunogenă. Subunitatea B facilitează legarea subunității toxice A la epiteliul intestinal. Gena care controlează sinteza subunității B a putut fi transferată unei tulpini de *E. Coli*, care sintetizează mari cantități de toxină B netoxigenă și imunogenă cu ajutorul căreia pot fi imunizați purceii, conferindu-li-se astfel protecție față de tulpinile enterotoxigene de *E. Coli*.

**Introducerea unor componente ale vaccinului subunitar** în bacterii se bazează practic pe același principiu descris anterior, cu singura deosebire că materialul genetic este introdus în bacterii care aparțin altor specii decât cea de la care provine acesta. Au fost transferate gene de la bacterii la virusuri (care însă nu s-au dovedit a fi gazde corespunzătoare din cauza capacității lor restrictive pentru ADN-ul străin), de la tulpini de *Shigella sonnei* patogene la mutante apatogene de *Salmonella typhi* etc.

Prin sinteză chimică sau biosinteză, au fost obținute 15 vaccinuri subunitare dintre care unele urmează a intra în uz până în anul 2000 (tabelul 10).

Tabelul 10

Vaccinuri subunitare care urmează a intra în uz până în anul 2000  
(după F.M. Audibert și L.D. Lise)

<i>Escherichia coli</i>	Virusul parainfluenzae
<i>Haemophilus influenzae</i>	Diferite specii de Plasmodium
Virusul hepatitei B	Virusul sincițial respirator
Virusul hepatitei de tip 1 și 2	Streptococul A și B
Virusul influenței A și B	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>



**Peptidele sintetice utilizate pentru vaccinare.** De regulă, la 5kD de proteină, în care se găsesc cca. 40 de reziduuri de aminoacizi, există un singur epitop, restul materialului, adică 30-35 de reziduuri, nefiind esențial pentru stimularea funcțiilor imune. Peptidele sintetice, nu sunt altceva decât realizarea *in vitro* a secvenței active de aminoacizi, adică de formare a epitopilor. Pentru aceasta, sunt identificate genele de la nivelul segmentului de ADN care codifică epitopul după care se asociază *in vitro* reziduurile aminoacide care intră în componența acestuia, obținându-se astfel peptide sintetice debarasate de tot balastul existent în vaccinul convențional. Până în prezent, a fost stabilită secvența completă a unor epitopi de la nivelul ADN-ului complementar al unor virusuri patogene și se încearcă obținerea de vaccinuri sintetice pentru a fi utilizate în practică ca agenți imunizanți.

Vaccinarea cu produse sintetice este foarte atrăgătoare, deoarece aceste produse nu conțin material infectant iar epitopii pot fi selecționați după dorința producătorului, conform scopului urmărit. Dar, peptidele sintetice au doar 10-15 reziduuri de aminoacizi. Pentru a deveni imunizante, ele trebuie să fie cuplate cu "molecule purtătoare" și cu adjuvanți. Diferite proteine, eritrocite, particule inerte, lipozomi sau acizi poliaminosintetici sunt utilizate frecvent ca molecule purtătoare, iar ca adjuvanți  $Al(OH)_3$ , MDP (muramil dipeptidul sau N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-izoglutamic), adjuvantul Freund complet etc., cu "calitățile" și "defectele" lor. De exemplu,  $Al(OH)_3$  stimulează doar sinteza anticorpilor circulanți, dar nu și imunitatea mediată celular, adjuvantul Freund complet poate fi utilizat doar la animale, dar nu și la om, deoarece provoacă necroze la locul de inoculare etc.

Rezultate încurajatoare au fost obținute prin folosirea unor peptide sintetice care reproduc fidel secvența aminoacizilor proteinei M din *Streptococcus pyogenes* sau pe cea a toxinei bacteriei. De exemplu, bucla  $NH_2$  terminală a toxinei diferite "confectionată" *in vitro* și cuplată la MDP stimulează sinteza de anticorpi și asigură protecția antitoxică. Toxina bacilului *Vibrio cholerae* are, ca și în cazul *E. Coli*, două subunități: subunitatea A, care activează adenilatciclaza, și subunitatea B, responsabilă de aderarea la receptorii celulei. Au fost sintetizate 9 peptide corespunzătoare subunității B care, cuplate la toxoidul tetanic cu rol de moleculă purtătoare, au asigurat o protecție satisfăcătoare organismelor imunizate. O situație similară a fost înregistrată și în cazul neurotoxinei de *Shigella dysenteriae*. De regulă sunt protectoare peptidele sintetice omoloage cu cele naturale atât la extremitățile  $NH_2$ , cât și la cele  $COOH$  terminale la care cudarea lanțului primar este identică. De exemplu, în cazul subunității B a neurotoxinei *Shigella*, la ambele extremități există câte un reziduu de Cys în pozițiile 4, respectiv 57, legate prin legături disulfidice (-S-S-), legare care realizează un epitop discontinuu dominant, expus la suprafața moleculei.

Vaccinurile antivirale sintetice constau din peptide liniare scurte, "confectionate" *in vitro*, capabile să inducă sinteza anticorpilor neutralizanți. De pildă, epitopii virusului febrei aftoase pot fi realizați prin peptide liniare sintetice, identice cu secvențele aminoacizilor între pozițiile 141-160 și 200-213. Un model bun pentru confecționarea de vaccinuri este virusul influenței deoarece este foarte bine cunoscută secvența aminoacidă din proteinele sale majore (hemaglutinina și nucleoproteina).

De dată mai recentă, folosirea vaccinurilor sintetice prezintă un mare interes și poate și o speranță în protecția anti-HIV, unde vaccinurile convenționale, vii sau atenuate, sunt total inoperante. Se încearcă obținerea de peptide hibride sintetice care să conțină numai epitopii HIV strict necesari antrenării mecanismelor de apărare imună. Și în unele parazitoze există tentative de aplicare a vaccinurilor



sintetice. În malarie de exemplu, la sporozoizi există o secvență tetrapeptidică (Asn-Ala-Asn-Pro) care se repetă de cca. 40 de ori și care, atașată la toxoidul tetanic, poate imuniza activ animalele de laborator.

**Anticorpilor anti-idiotip folosiți ca vaccinuri.** Pe baza "teoriei rețelei" a lui N. JERNE, se încearcă folosirea – ca antigene stimulante în vaccinări – a anticorpilor anti-idiotip de generația a 2-a ( $A_2$ ), care mimează perfect conformația sterică a epitopului. Este în studiu posibilitatea de folosire a anticorpilor  $A_2$  în locul antigenelor naturale în combaterea și prevenirea hepatitei epidemice cu virusul B, în poliomielită, rabie, *Trypanosoma cruzi* etc. Practic, se preconizează identificarea secvenței genelor din ADN care controlează sinteza paratopului  $A_2$  și, apoi, obținerea acestuia pe cale sintetică.

Avantajele folosirii vaccinurilor anti-idiotip ar fi mari deoarece ele sunt strict monospecifice, nu pot provoca boala naturală, nu implică manipulare de material infecțios și nu pot avea efecte secundare negative asupra organismului. Rămâne de văzut însă dacă aplicarea lor în practică nu va fi cumva limitată ca potențial imunizant datorită extremei specificități a situsului combinativ. În prezent, costul ridicat al acestor vaccinuri, tehnologiile complicate de obținere a lor, insuficienta cunoaștere a structurii epitopilor multor antigene reprezintă dificultăți care trebuie depășite, dar care vor fi depășite probabil în scurt timp.

Oricum, este sigur că omenirea se îndepărtează din ce în ce mai mult de "epoca pasteuriană" a vaccinărilor, care va rămâne în istoria medicinei ca un moment major de referință, orientându-se spre "epocile viitorului", în care să sperăm că "sinteticul" în toate domeniile de activitate, și nu numai în cel menționat aici, nu-l va îndepărta pe om de la "natural", transformându-l dintr-o ființă spirituală în una prin excelență pragmatică, cu proprietăți de "mașină" care fabrică la rece necesarul său, uneori în detrimentul mediului înconjurător.

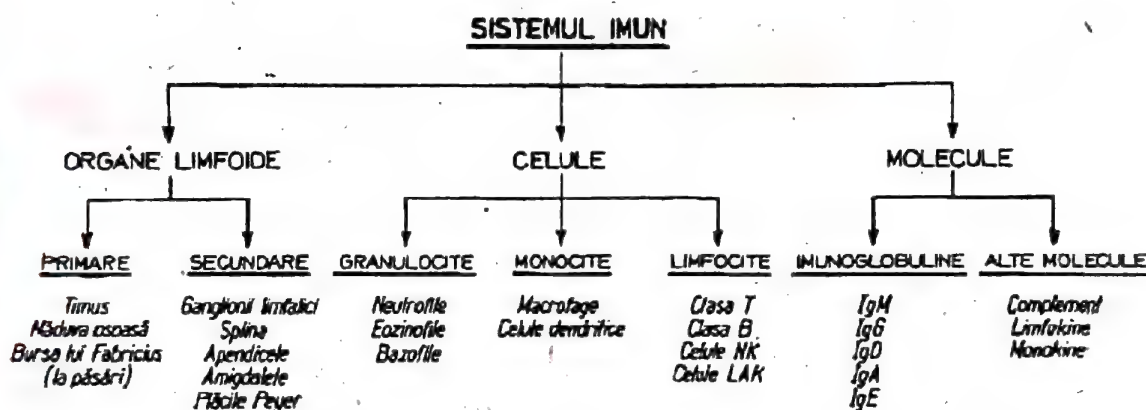


## MIJLOACELE SPECIFICE ALE APĂRĂRII IMUNE

Răspunsul imun este expresia conflictului dintre agresor pe de o parte (bacterii, paraziți, virusuri, toxine etc.) și organismul agresat pe de altă parte. Agresorul, prin antigenele sale (analizate în capitolul precedent), deranjează funcțiile normale ale gazdei și generează din partea acesteia reacții de apărare care vizează neutralizarea acțiunii lui. Aceste reacții păstrează amintirea contactului cu agresorul și contribuie la menținerea homeostaziei organismului, adică păstrează în limite normale funcțiile sale. Menținerea homeostaziei este realizată de către un sistem specializat în acest sens, denumit *sistemul imun*, alcătuit din organe, celule și molecule (tabelul 11).

Tabelul 11

Principalele componente ale sistemului imun



Componentele sistemului imun se găsesc dispersate în tot organismul și reprezintă cca. 1% din greutatea acestuia, adică cca. 0,7-1 kg greutate proprie.

### ORGANELE LIMFOIDE

Din punct de vedere structural, organele limfoide sunt formate dintr-o textură de bază alcătuită din celule reticulare care se unesc între ele formând o rețea în ochiurile căreia se găsesc celulele sistemului imun (macrofage, limfocite, celule dendritice etc.). Aceste structuri sunt delimitate la exterior de către o capsulă conjunctivă din care pornesc spre interior travee care delimitează compartimente în interiorul organului.



După modul de apariție în embrio-geneză și după atributele lor funcționale, organele limfoide se împart în două grupe: a) primare și b) secundare. Și unele și altele au caracteristici particulare care le deosebesc fundamental (fig. 13; v. mai departe tabelul 12). Esența acestor deosebiri este în primul rând de ordin funcțional: organele limfoide primare "educă" precursorii celulari în vederea îndeplinirii ulterioare a funcțiilor lor, pe când cele secundare sunt sediul în care celulele maturate își desfășoară cea mai mare parte a atributelor lor. La păsări și mamifere, organele limfoide primare sunt timusul, măduva osoasă și bursa lui Fabricius, echivalentul măduvei osoase la păsări. Funcția limfopoietică a acestora este condiționată de popularea lor cu celule tinere, imature, adică cu "progenitori" derivați din celula matcă de la nivelul ficatului embrionar sau măduvei osoase.

Alterările morfo-funcționale ale organelor limfoide primare sunt urmate de dereglări calitative și cantitative ale funcțiilor imune, situație care nu se înregistrează, sau este de minoră importanță, în cazul organelor limfoide secundare.

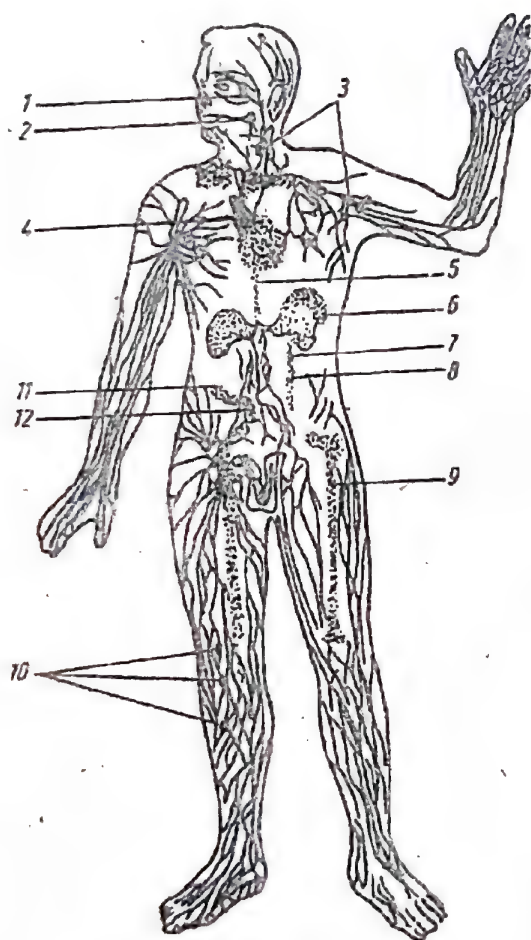


Fig. 13. Organizarea sistemului limfoid uman. 1-ganglioni parotidieni; 2-amigdale; 3-ganglioni cervicali și axilari; 4-timus; 5-canalul toracic; 6-splina; 7-plăci Peyer și aglomerații limfoide de la nivelul intestinului subțire (8); 9-măduvă osoasă (măduva oaselor lungi este hematogenă numai la copii); 10-vase limfatice; 11-apendice; 12-organe limfoide diseminate la nivelul intestinului gros.

## ORGANE LIMFOIDE PRIMARE

### TIMUSUL

Este format din celule epiteliale derivate în timpul embriogenezei din celule de origine ectodermală și endodermală. Organul se dezvoltă din rudimentele epiteliale ale pungilor brahiale, care vor forma două cordoane care coboară în mediastin până la nivelul inimii. În luna a 2-a de dezvoltare embrionară, în rudimentele epiteliale pătrund trabecule cartilaginoase și vase sangvine, timusul căpătând o structură lobulară. Acum este colonizat intensiv, cu celule hemopoietice de origine medulară (din celula matcă) care se formează aici (limfocite T), cu macrofage, celule dendritice etc. Toate aceste elemente celulare sunt organizate într-o structură bine definită histologic și alcătuiesc două zone distincte: corticală și medulară.

Un strat exterior gros și unul subțire formează capsula corticală



bogată în sinusuri subcorticale. Trabeculele de fibroblaste și collagen pătrund în cortex, terminându-se la joncțiunea cu medulara. Acestea conțin fibroblaste, adipocite, eozinofile, neutrofile, mastocite și macrofage. Macrofagele din timus sunt heterogene din punct de vedere morfologic și funcțional. Cele din corticală sunt bogate în lizozomi și sărace în antigene de histocompatibilitate (MHC) de clasa II, iar cele din medulară, lipsite de funcții fagocitare, ar fi mai bogate în antigene MHC de tip II și mai sărace în cele de tip I. Celulele dendritice, prezente în special la joncțiunea cortico-medulară, exprimă intens antigenele MHC contribuind, împreună cu celelalte populații celulare, la crearea "microclimatului" acestui organ, necesar maturării funcționale a progenitorilor limfocitari.

Primul epiteliu care se dezvoltă este cel cortical, după care încep să apară mici insule medulare, concomitent cu celulele care exprimă antigenele MHC I și II. Epiteliul cortical este bogat în filete nervoase și în neuropeptide, iar cel medular în celule care exprimă intens antigenele MHC. În arhitectura timusului sunt și arii lipsite de epiteliu, corespunzând locurilor lipsite de antigene MHC.

După naștere, timusul continuă să crească, atingând dimensiunile maxime la vârsta de 10-12 ani, când are greutatea de 30-40 de grame. Dezvoltarea zonei corticale depășește întotdeauna pe cea a medulei (fig. 14). După vârsta de 30 de ani, involuează dar nu dispare complet. Funcția principală a acestui organ este realizată în etapele timpurii ale vieții și imediat post-natal.

La om, timusul are doi lobi și este situat în mediastinul superior în spatele manubriului sternal. Lobii sunt uniți între ei printr-un istm. Din capsula fibroasă cu care sunt înveliți la exterior, pătrund în interior septuri conjunctive care delimitează parenchimul organului (fig. 15), fiecare lob având o zonă

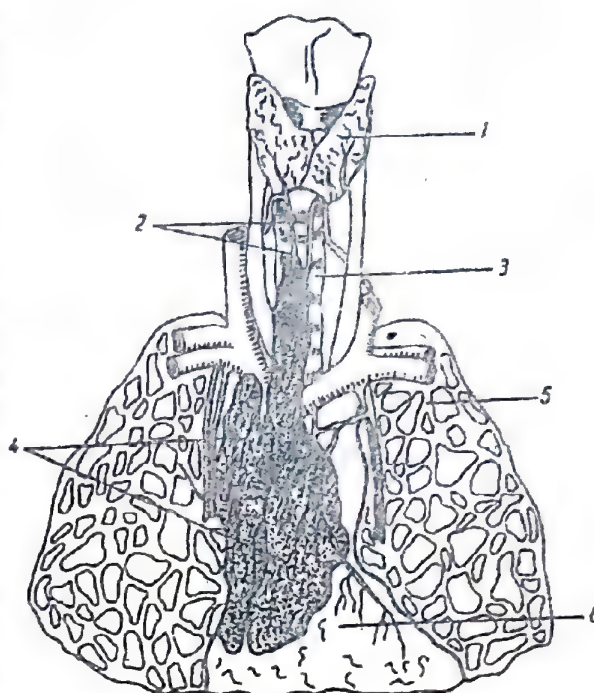


Fig.14. Poziția timusului în cavitatea toracică. 1- glanda tiroidă; 2-vase sangvine ale timusului; 3- trahee; 4-timusul; 5-pulmonul; 6-pericardul.

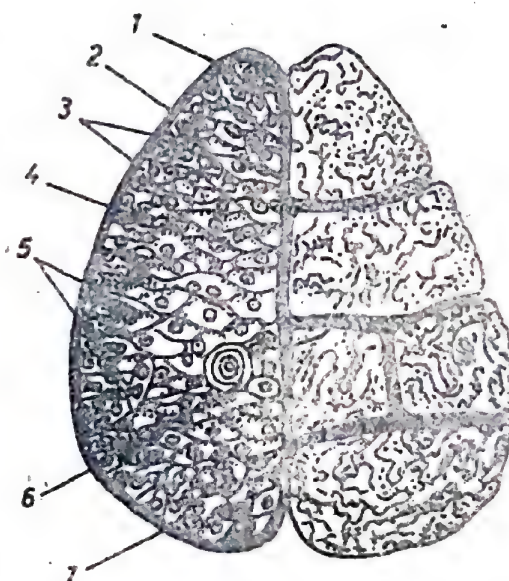


Fig.15. Structura histologică a timusului. Organul are o capsulă fibroasă din care se desprind travese conjunctive care-l împart în compartimente (lobi și lobuli timici). Parenchimul său este un reticul epitelial în care se găsesc precursori limfocitari aflați în diferite stadii de dezvoltare. La exterior este "zona corticală", iar spre interior "zona medulară". 1- capsulă; 2-zona corticală; 3- limfocite; 4-epiteliu reticular; 5-vase sangvine; 6-corpusculi Hassel; 7- medulară.



corticală situată la exterior, și una medulară situată central. Pentru maturarea limfocitelor educate aici (limfocite timo-dependente sau *T*), descendentele celei matcă ajung în zona corticală și de acolo în medulară, continuarea maturării lor fiind critic dependentă de interacțiile cu celulele stromei. Pe măsura maturării lor, celulele se deplasează de la corticală spre medulară, unde-și câștigă competența funcțională după care, prin vasele eferente, părăsesc organul ajungând în circulație. Vasele limfatice aferente timusului lipsesc, organul având numai vase sangvine, arteriolele din regiunea corticală formând o rețea de capilare care, trecând prin zona medulară, se unesc deschizându-se spre sinusurile venoase.

Mitoza la nivelul acestui organ este foarte activă, dovadă în acest sens fiind și conținutul foarte mare de ADN. Aici ciclul celular se realizează în 4-6 ore, populația de timocite fiind înlocuită total în decurs de 4-6 zile, deși numai cca. 5% dintre acestea reușesc să ajungă la maturitatea funcțională. Popularea cu precursori limfocitari a zonelor corticală și medulară a timusului înregistrează diferențe notabile: raportul dintre numărul limfocitelor și cel al celulelor epiteliale reticulare este de 100 : 1 în corticală și de numai 20 : 1 în medulară.

În zona medulară sunt *corpusculii lui Hassal*, formați din celule epiteliale care, în centrul acestor formații, încep să degenereze fiind înlocuite treptat de către celule venite din exterior. Numărul acestor corpusculi, precum și dimensiunile lor cresc o dată cu vârsta și cu impactul organismului cu unele boli infecto-contagioase. Se pare că celulele epiteliale de la nivelul corpusculilor lui Hassal au funcții fagocitare. În zona medulară a timusului sunt sintetizate glicoproteine, niște adevărați hormoni care stimulează limfopoieza, măresc masa organelor limfoide secundare și contribuie la maturarea limfocitelor *T* aflate în afara timusului.

În acest organ limfoid primar are loc o proliferare continuă a limfocitelor, în absența oricăror stimuli exogeni. De exemplu, la animalele gnotobiotice (cu floră cunoscută și controlabilă), la care nu există nici un fel de stimul antigenic, organele limfoide secundare, ca de pildă ganglionii limfatici, splina etc. sunt atrofiat, în timp ce timusul nu prezintă nici un fel de modificări. El este un organ autonom, protejat de bariere hematotimice, cu funcții secretorii endocrine care au un rol principal în maturarea funcțională a precursorilor limfocitari ajunși la acest nivel și care vor forma una dintre cele două clase majore de limfocite, și anume clasa limfocitelor *T*.

Timectomia imediat post-natală a șoarecilor este urmată de instalarea unei alterări fiziologice caracteristice, cunoscută sub denumirea de "boala pipernicirii" ("runt disease"), manifestată clinic prin stagnare în creșterea greutății corporale, aglutinarea și căderea părului, diaree, dermatite, precum și prin abrogarea funcțiilor dependente de limfocitele *T* (fig. 16). La aceste animale se înregistrează o atrofie treptată a țesuturilor limfoide, hiperplazia elementelor reticuloendoteliale, scăderea numărului de limfocite din circulație (pe seama limfocitelor *T*) și creșterea compensatorie a procentului de granulocite neutrofile. Ele nu pot rejecta grefele cutanate sau de organe și nu pot supraviețui în mediul înconjurător mai mult de 1-3 săptămâni de la apariția primelor semne de "boală de pipernicire", dar pot supraviețui normal în condiții de sterilitate absolută a mediului și alimentelor.

Extirparea timusului la animalele mature nu are o influență atât de mare asupra reactivității imunologice, deoarece organele limfoide secundare au fost deja populate cu limfocite *T* mature.

În afară de timectomia experimentală, realizată în mod deliberat la animale, există și atimii congenitale apărute spontan. Este cazul atimiei congenitale umane cunoscută sub denumirea de "sindromul Di George", caracterizat prin inexistența rejecției de grefe de țesuturi sau organe, prin lipsa de sinteză a anticorpilor consecutiv stimulului cu antigene timo-dependente, prin infecții cronice bacteriene și fungice și prin sfârșit letal. Copiii cu acest sindrom fac de fapt "boala pipernicirii".





Fig.16 A. Aspectul și dimensiunile corporale ale șoarecilor timentomizați neonatal în comparație cu frații lor normali (x).



Fig.16 B. Șoarece timentomizat neonatal. Animalul este "pipernicit" (slab, cu părul crescut neomogen, vertebrele caudale vizibile, diaree etc.).

La șoareci, se cunoaște o tulpină la care, în caz de homozigoție, există atimia congenitală cu tot cortegiul ei de simptome. Șoarecii, cunoscuți sub denumirea de *Nu/Nu*, sunt lipsiți de păr (de aici și denumirea de "nuzi") și de posibilitatea de a dezvolta răspuns imun dependent de limfocitele T.

Este posibil ca acest sindrom să apară spontan și la alte mamifere. De exemplu, la iepuri, se înregistrează uneori cazuri similare cu "boala de pipernicire". Ea apare foarte rar la câte 1-2 pui din populația unui cuib și se manifestă prin lipsa părului de pe toată suprafața corpului cu excepția capului, prin stagnarea în creștere și, în final, prin moarte consecutiv infecțiilor cu germeni banali, apatogeni (fig. 17). Se pare că acest sindrom, de altfel puțin studiat, este, ca și la șoarecii *Nu/Nu*, sub control genetic. Sunt și situații de inflamație a timusului (timite), fie ca urmare a unor infecții grave, fie datorate unor procese neoplazice. Și în aceste cazuri, disfuncția organului este evidentă și însoțită de simptomatologia descrisă anterior.

Fig.17. Pui de iepure cu atimie congenitală. Se observă dimensiunile corporale și lipsa părului. Capul, urechile și labele au aspect normal. Animalul a fost fotografiat alături de un frate al său, normal.



#### BURSA LUI FABRICIUS

Este un organ limfoepitelial central, specific păsărilor și responsabil de maturarea funcțională a celei de-a doua clase de limfocite, limfocitele B, care vor secreta anticorpi.



Din punct de vedere anatomic, acest organ este asemănător cu timusul, dezvoltându-se în regiunea cloacei din rudimentele embrionare (fig. 18). Ca și timusul, bursa are inițial o structură epitelială pură, pentru ca mai târziu să fie colonizată cu precursorii pre-bursali veniți aici din sacul vitelin sau din ficatul embrionar. La 13-19 zile de viață embrionară, ea devine un organ pur limfoid și sursă de limfocite *B*. La două luni de la ecloziune involuează, menținându-și, ca și timusul, funcțiile secretorii prin care sunt maturate celulele *B* imature aflate în circulație. Puii bursectomizați imediat posteclozional nu pot sintetiza anticorpi dacă sunt stimulați antigenic cu antigene timo-dependente sau timo-independente, dar dezvoltă în limite normale reacțiile imune mediate celular (rejecție de grefe etc.). Organele lor limfoide sunt sărace în celule *B*, nu au plasmocite iar în ser nu există practic imunoglobuline, animalele fiind expuse infecțiilor bacteriene și virale, infecții care le sunt fatale.

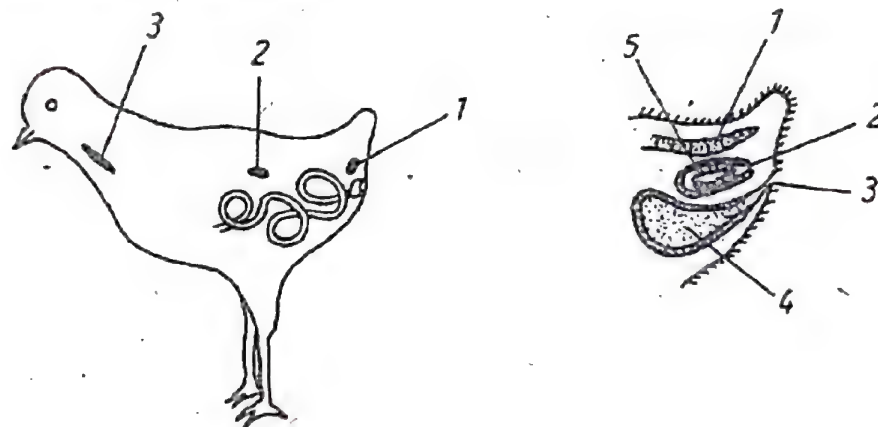


Fig.18. Bursa lui Fabricius la păsări. A. Poziția în organism a bursei (1), splinei (2) și timusului (3). B. Organe și formațiuni existente în zona anală la păsări. 1-vertebre caudale; 2-ductul bursei; 3-anus; 4-cloaca; 5-bursa lui Fabricius.

#### MĂDUVA OSOASĂ

Măduva osoasă, echivalentul bursal la mamifere, are o dublă funcție: a) de organ limfoid central și b) de organ limfoid generator de celule matcă.

La copii, aproape toată măduva osoasă este activă hematopoietic, pe când la adulți hematopoieza are loc numai la nivelul oaselor late ale capului și trunchiului, măduva oaselor lungi ale membrilor transformându-se în măduvă grasă, nehematogenă. La animalele iradiate s-au putut reconstitui toate elementele sângelui, inclusiv limfocitele, după transfer de măduvă osoasă. În splina lor apar aglomerații de celule sangvine în curs de maturare, adevărate colonii de precursori derivați dintr-o singură celulă matcă în care se găsesc elementele tuturor liniilor celulare ale sângelui.

La nivelul măduvei hematoformatoare, în afară de celulele matcă, se găsesc și descendentele acestora aflați în diferite stadii de maturare. În cazul limfocitelor, de pildă, aici se găsesc precursori *B*, limfocite *B* mature funcțional și chiar și plasmocite capabile să secrete anticorpi, dar nu se găsesc limfocite *T* mature, ci numai precursorii timpurii ai populației celulare care urmează să migreze către timus în vederea maturării lor. Proporțional, în măduvă, majoritatea celulelor aparține seriei granulocitare (cca. 60%), urmată în ordine descrescândă de seria eritocitară (cca. 20-30 %) și megakariocitar-limfocitară (cca. 20%). Proporția



limfocitelor în toată această populație este mai mare la copii decât la adulți; 20-30% la prima categorie de vârstă și 5-15% la cea de-a doua.

Limfocitele pot exista atât ca elemente izolate, dispersate printre elementele aparținând altor categorii de populații celulare, cât și ca mici aglomerații, sub forma foliculară. La nivelul acestui organ, prezența plasmocitelor secretoare de anticorpi este accidentală, ele fiind în număr mic, de regulă sub 1%, deoarece măduva, ca și timusul, nu este locul în care limfocitele au potențialul și posibilitatea să primească și să reacționeze la stimuli organici.

Circulația în măduva osoasă se face pe cale sangvină, sângele ajungând aici prin arteriolele care traversează periostul și osul compact sub forma unor mici canale. Părăsirea organului de către celulele devenite imunocompetente se face prin sinusurile venoase care colectează elementele mature pentru a fi distribuite apoi în organele limfoide secundare de la nivelul întregului organism. Precursorii care urmează a se matura funcțional în timus, deci care vor deveni limfocite *T*, vor pleca spre acest organ, iar cei care vor fi educați în măduvă spre a deveni limfocite *B* vor rămâne pe loc, deși nu este exclus ca o mică parte să migreze spre țesutul limfoid asociat intestinului unde să-și capete competența funcțională.

## ORGANELE LIMFOIDE SECUNDARE

Organele limfoide secundare sunt ganglionii limfatici, splina, plăcile Peyer, amigdalele, apendicele, aglomerările limfoide de la nivelul pielii și mucoaselor, toate populate de către limfocitele "instruite" în organele primare. Alterările morfofuncționale ale organelor secundare nu afectează grav capacitatea de apărare imună a organismului.

### GANGLIONII LIMFATICI

Ganglionii limfatici sunt structuri mici, nodulare, situate de-a lungul vaselor limfatice și la principalele intersecții ale acestora. Prin partea concavă a zonei centrale a unui ganglion limfatic pătrund arteriolele și fibrele nervoase și părăsesc organul venulele și vasele limfatice eferente. Limfaticele aferente pătrund prin partea convexă a organului, traversând capsula oblic (fig. 19). Pereții lor se contopesc cu capsula iar endoteliul vaselor trece în endoteliul sinusului marginal al ganglionului. De la capsula cartilaginoasă (formată din fibre elastice, celule ale mușchilor netezi și collagen) care acoperă ganglionul limfatic pleacă radial spre centru trabecule fibroase, care împreună cu fibrele de reticulină alcătuiesc suportul componentelor celulare. Ganglionul are o zonă corticală unde limfocitele sunt aglomerate sub formă de foliculi limfatici cu diametrul de 0,5 - 1 mm și o

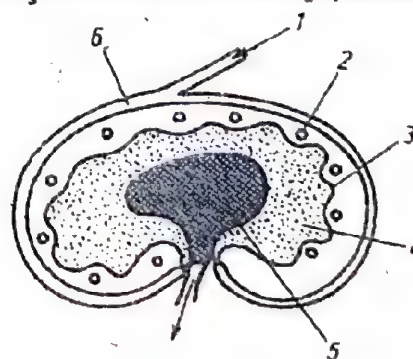


Fig.19. Structura unui ganglion limfatic. 1-limfaticele aferente; 2-folicul limfoid; 3-zona corticală; 4-zona paracorticală; 5- zona medulară; 6-sinus marginal.



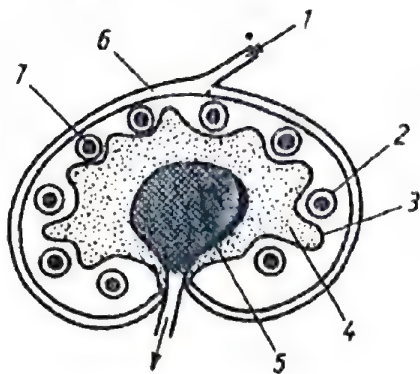


Fig.20. Structura unui ganglion limfatic după o stimulare antigenică puternică a organismului. Se observă hiperplazia foliculilor limfoizi (7).

zonă medulară în care celulele sunt dispuse sub formă de corzi radiale, ambele zone alcătuind "ariile B-dependente" ale lui.

La periferia medularei este zona paracorticală, o arie "T-dependență" unde, în afară de limfocitele T, se găsesc din abundență și celule antigen-prezentatoare. Foliculii limfatici din zona corticală au un "centru germinativ" sau "centru reactiv" bogat în celule reticulare și în special în celule limfatice aflate în diferite stadii de proliferare. Dimensiunile centrilor germinativi sunt direct proporționale cu intensitatea stimulului antigenic. Tot aici are loc și sinteza anticorpilor (fig. 20). Stimularea cu antigene timo-dependente, care activează limfocitele T, este urmată de hipertrofierea zonei

paracorticală ca urmare a proliferării acestei clase limfocitare. Dovada o constituie faptul că, în atimii congenitale unde limfocitele T lipsesc, hipertrofia acestei zone este absentă. După stimulul antigenic timo-dependent sau timo-independent, proliferază și foliculii limfatici din corticală, ca urmare a multiplicării populației B.

Foliculii sunt despărțiți unii de alții prin spații interfoliculare în care sunt numeroase macrofage. De la foliculi către zona medulară sunt orientate niște cordoane de țesut reticular în spațiile cărora se găsesc limfocite. Ganglionii au sinusuri, niște spații situate între capsulă, trabeculele fibroase și masa celulară a zonelor respective, situate marginal sau periferic, cortical, portal etc., prin care circulă limfa și celulele ce migrează din și înspre foliculii limfatici și cordoanele medulare.

Prin intermediul ganglionilor limfatici, al ductului și al sistemului vascular, limfocitele realizează circulația și recirculația lor și iau parte la efectuarea reacțiilor imunologice. Aproximativ 95% dintre limfocitele ganglionilor limfatici sunt celule circulante care migrează din sânge în țesutul ganglionar și invers, prin venulele postcapilare și limfatice eferente, din ganglion sau circulație.

În cazul unor leziuni ale pielii sau mucoaselor, agenții străini și în special bacteriile pătrund în organism și ajung prin canalele limfatice în ganglionii limfatici care reprezintă prima barieră în calea dispersării lor. De regulă, agresorii sunt reținuți la acest nivel unde sunt fagocitați și distruși de către macrofage. Numărul limfocitelor între timp crește, diferența de aspect dintre zonele corticală și paracorticală devine din ce în ce mai puțin evidentă și după 3-4 zile își fac apariția primele plasmocite producătoare de anticorpi care devin din ce în ce mai numeroase atât în zona foliculilor, cât și la nivelul cordoanelor medulare. Sunt și situații în care unele bacterii, cum ar fi mycobacteriile sau brucelele, nu sunt distruse de către celulele fagocitare, înmulțindu-se la nivelul ganglionilor limfatici. Așadar, ganglionii limfatici sunt organe limfoide secundare care dețin un rol important în realizarea răspunsului imun mediat celular și umoral și, implicit, în apărarea organismului față de diferite agresiuni bacteriene sau virale.

## SPLINA

Splina este al doilea organ limfoid ca importanță care însă, spre deosebire de ganglionii limfatici, pe lângă funcțiile imune, are și alte attribute biologice, ca de pildă colectarea și distrugerea celulelor moarte, cu referire specială la hematii,



depozitarea rezervelor de  $\text{Fe}^{2+}$ , reglarea circulației etc. La periferie, organul are o capsulă din care pornesc trabecule spre interiorul lui, interior în care se găsește "pulpa albă" și "pulpa roșie". Pulpa albă este bogată în țesut limfoid organizat sub formă de mânșoane în jurul unor arteriole centrale, cu limfocitele *T* dispuse periarteriolar formând aria timo-dependentă, și cele *B* dispuse periferic, formând "foliculii splenici" denumiți și "corpusculii Malpighi". Pe lângă limfocite pulpa albă este bogată în macrofage și celule dendritice având centrii germinativi care sunt de fapt arii periferice *B*-dependente. Se crede că foliculii limfoizi și centrii germinativi ar fi locul manipulării antigenelor care duc la sinteza anticorpilor de către plasmocite. Principala funcție a foliculilor ar fi generarea celulelor *B* de memorie. În ariile *T*- și *B*-dependente sunt "zone marginale" la nivelul cărora se găsesc macrofage specializate care, împreună cu celulele dendritice, prezintă antigenul limfocitelor *T* și *B*. Tot la acest nivel există numeroși plasmoblaști și plasmocite. Pulpa roșie este formată din corzi mărginite de macrofage, la nivelul ei fiind distruse eritrocitele.

Splina este lipsită de vase limfatice, circulația limfocitelor în acest organ făcându-se exclusiv prin circulația sangvină care aduce aici, pe lângă celulele sistemului imun, și antigenele solubile inoculate intravenos sau cele pătrunse accidental în circulație, motiv pentru care acest organ este bogat în plasmocite.

Splenectomia la om nu influențează semnificativ capacitatea de apărare imună, deși modifică întrucâtva reactivitatea imunologică a organismului, persoanele splenectomizate fiind mai sensibile la acțiunea unor germeni sau paraziți (vezi Tuftsina).

#### AMIGDALELE

Situate în foseta tonsilară între arcurile palatinului, sunt organul principal al inelului limfatic Valdeer. Au aspectul unui ou turtit, partea laterală a suprafeței lor fiind acoperită cu o capsulă fibroasă prin care pătrund vasele de sânge, iar suprafața liberă, orientată către faringe, este acoperită cu un strat epitelial. Capsula are o mulțime de fibre conjunctive care pătrund în parenchim, formând trabecule în care se găsesc numeroase aglomerări de foliculi limfoizi. Principalul element structural al amigdalelor este "criptocitul" (fig. 21), la nivelul criptelor epiteliale din parenchim (fig. 22) realizându-se simbioza limfo-epitelială, element structural caracteristic organelor limfoide primare.

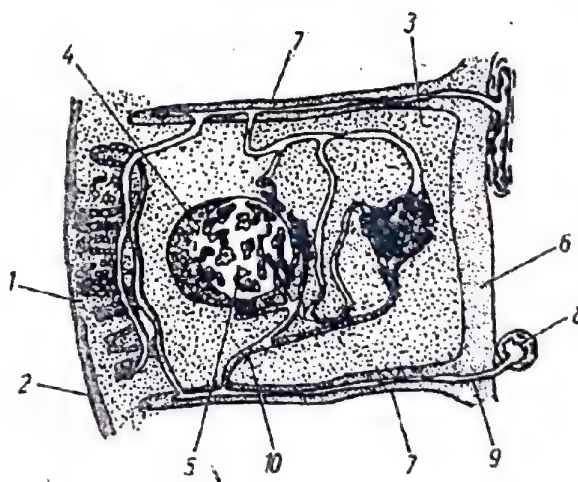


Fig.21. Schema criptolimfonului la amigdale. 1- simbioza limfoepitelială; 2- epiteliul criptic; 3- țesutul limfoid extramedular; 4- foliculul secundar; 5- centrul foliculului secundar; 6-capsula; 7- trabecule mici; 8- arteriolă; 9-segmentul capsular al arteriolelor; 10- segmentul paranchimal amigdalian al arteriolelor.



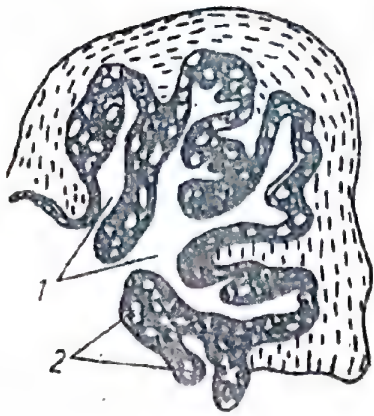


Fig.22. Cripte și foliculi limfoizi la nivelul amigdalelor. 1-cripte; 2-foliculi limfoizi.

de alterări importante ale capacității de apărare a zonei bucale și îndeosebi a regiunii laringo-faringiene.

### PLĂCILE PEYER

Plăcile Peyer sunt aglomerații de celule limfoide de la nivelul "laminei propria" a mucoaselor intestinului subțire, răspândite de-a lungul lui (fig. 23). Se găsesc răspândite în mucoasa jejunului, duodenului și în special a ileonului, sub formă de foliculi limfatici solitari, cu diametrul de maximum 3 mm, dar foarte numeroși, la persoanele adulte putând ajunge până la  $15 \times 10^3$  de astfel de formații solitare. După colonizarea bacteriană a intestinului formațiunile solitare se pot uni între ele, formând plăci cu lățimi variabile, care uneori ajung până la 1 cm și, de asemenea, cu lungimi variabile de câțiva centimetri, numărul lor micșorându-se cu vârsta.

Atât foliculii solitari cât și plăcile Peyer au centri reactivi unde are loc limfopoieza. Acești centri sunt înconjurați de un strat compact de limfocite care formează zona corticală a formațiunii respective. Circulația limfocitelor de la aceste formații, dinspre ele și către ele, se face prin vasele limfatice ale vilozităților intestinale care sunt în legătură cu circulația limfatică generală, inclusiv cu ductul limfatic al toracelui. Limfocitele de la nivelul tubului digestiv, care alcătuiesc aceste formațiuni, au un rol foarte important în apărarea imună locală, ele sintetizând de predilecție imunoglobulinele aparținând clasei IgA, cu rol nu numai în apărarea specifică locală, dar și în reglarea microflorei intestinale.

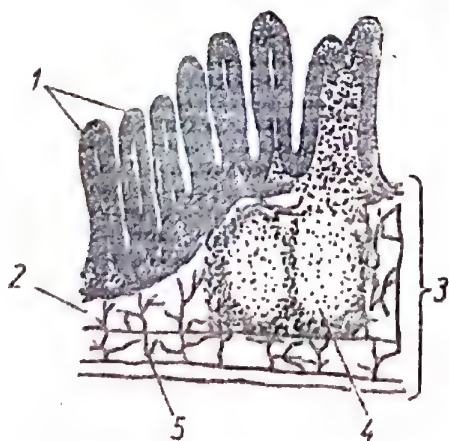


Fig.23. Mucoasa intestinului subțire (aspect pe secțiune a plăcii Peyer). 1-vilozități intestinale; 2-epiteliul intestinal; 3-placă Peyer (situată sub-epitelial); 4- centrul nervos proliferativ; 5-vase limfatice.



Apendicele este unul dintre cele mai mari organe limfoide ale tubului digestiv. În componența sa se găsesc numeroase aglomerări de celule limfoide, organizate sub formă de "foliculi limfoizi" cu un centru de proliferare celulară în care predomină limfocitele *B* și plasmocitele secretoare de anticorpi. Ca și în cazul ganglionilor limfatici sau splinei, foliculii limfoizi ai apendicelui au centrul germinativ mai dezvoltat atunci când organul este expus unor stimuli antigenici puternici.

Multă vreme s-a considerat că la mamifere ar fi posibil ca apendicele să fie organ limfoid primar, echivalentul bursei lui Fabricius de la păsări dar, prin diferite tehnici de investigare, cum ar fi iradierile letale și reconstituirile sau ablația chirurgicală a acestui organ, s-a demonstrat că de fapt el este un organ limfoid secundar care face parte din aglomerările limfoide asociate tubului digestiv.

În afară de organele limfoide amintite, se găsesc răspândite în tot organismul, în punctele cele mai vulnerabile și expuse agresiunilor venite din exterior, mici aglomerări celulare sau chiar limfocite izolate. Acestea sunt situate aproape de suprafața organului respectiv, de regulă sub mucoasele aparatului respirator (trahee, bronhii, bronhiole etc.), în piele, rinichi, creier etc., unde ajung prin circulația sangvină și de unde reintră în circuitul general al organismului. La aceste nivele ele vin în contact cu macrofagele și cu alte celule prezentatoare de antigen, primind informații despre agresor pentru a participa la reacțiile locale sau generale de apărare specifică a organismului.

## SÂNGELE

Sângele este considerat de către unii autori o componentă periferică a sistemului imuni, deoarece în el se găsesc practic toate elementele celulare și moleculare ale acestuia, adică limfocitele *T* și *B*, monocitele (forma circulatorie a macrofagelor), granulocitele și chiar și celule sușă. Deși sângele conține cea mai mare parte dintre limfocitele existente în organism, totuși el nu poate fi considerat un "organ limfoid secundar", ci doar o rețea de căi de comunicație care face legătura între diferitele organe limfoide. Într-adevăr, diferitele populații celulare aflate în circulație, cum ar fi granulocitele, monocitele, limfocitele etc., pătrund sau părăsesc organele limfoide sau ne-limfoide, folosind ca arteră de circulație și calea sangvină.

Dacă unele celule, cum ar fi hematiile sau granulocitele din sânge, reflectă fidel situația lor în organism, altele, ca de pildă limfocitele, pot uneori să difere ca număr sau funcționalitate atunci când sunt în sânge, în comparație cu populațiile din alte organe. Din totalul limfocitelor, doar 5-10% ( $2,5 \times 10^9$  celule) ajung în torentul sangvin fie ca celule mature virgine, fie precursori celulari imaturi. Numeroși factori endogeni sau exogeni pot induce mari variații în structura acestei populații periferice (tabelul 12), așa că nu întotdeauna celulele de la nivelul venelor sau arterelor, în special cele limfoide, reflectă realitatea existentă la nivelul întregului organism.



Tabelul 12

Diferiți factori care pot afecta compoziția subseturilor de limfocite din sânge  
(după J. Westermann și R. Pabst)

Factori	Populații sau subpopulații celulare	Sensul numeric al modificării
<i>Medicamente, hormoni</i>		
Cimetidina	Linfocite T (CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> )	Crește
Ciclofosfamida	Linfocite B	Scade
Ciclosporina A	CD8 <sup>+</sup>	Crește
Endotoxina	CD4 <sup>+</sup>	Scade
Epinefrina	CD8 <sup>+</sup>	Crește
Glucocorticoizii	CD4 <sup>+</sup>	Scade
Insulina	Linfocite B	Crește
Interleukina - 2	CD25 <sup>+</sup>	Crește
<i>Proceduri medicale</i>		
Anestezii, operații	CD4 <sup>+</sup>	Scade
Splenectomie	Linfocite B	Crește
<i>Diferite stări patologice</i>		
Candidoze	CD4 <sup>+</sup>	Scade
Scleroza multiplă	CD4 <sup>+</sup> ; CD45 <sup>+</sup>	Scade
Pneumonii	CD4 <sup>+</sup>	Scade
Sarcoidoză multiplă	CD8 <sup>+</sup>	Crește
Pielonefrită	CD4 <sup>+</sup>	Scade
SIDA	CD4 <sup>+</sup>	Scade
Boala Hashimoto	CD4 <sup>+</sup>	Crește
Purpura trombocitopenică	CD4 <sup>+</sup>	Scade
Lupusul eritematos	CD4 <sup>+</sup> ; CD45 <sup>+</sup>	Scade
<i>Alte condiții</i>		
Vârsta înaintată	CD4 <sup>+</sup> ; CD45R <sup>+</sup>	Scade
Sarcină	CD4 <sup>+</sup>	Scade
Nicotina	CD4 <sup>+</sup>	Crește
Stres acut	CD8 <sup>+</sup>	Crește
Stres cronic	CD8 <sup>+</sup>	Scade

Notă: Referitor la simbolurile CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> etc., vezi capitolul "Markeri antigenici".

În esență, organele limfoide primare și secundare au atribute funcționale foarte precise, asemănându-se între ele prin aceea că și unele și altele participă la apărarea imună, dar deosebindu-se prin modul cum realizează această participare. Tabelul 13 redă unele dintre aceste deosebiri.



Caracteristici principale ale organelor limfoide

Caracteristica	Organul limfoid	
	Primar	Secundar
Momentul dezvoltării în embriogeneză	În timpuriu	Târziu
Proveniența celulelor care populează organul	Din celule matcă	Din celule instruite în organele primare
Popularea cu elemente limfoide precursore sau mature	În timpuriu, perinatal	După naștere
Proliferarea celulelor la nivelul organelor se face	În absența stimulului antigenic	Sub influența antigenului
Activitate hormonală	Prezentă	Absentă
Simbioza limfoepitelială	Prezentă	Practic absentă
Existența ariilor de dependență celulară	Absente	Prezente
Starea organului în relație cu vârsta	Involuează pe măsura înaintării în vârstă	Nu involuează o dată cu vârsta
Circulația limfocitelor la nivelul organului se face	Într-un singur sens; celulele care părăsesc organul nu mai revin	În dublu sens, celulele putând reveni în organul din care au plecat
Efectul extirpării organului asupra răspunsului imun	Reacțiile imune sunt profund alterate	Reacțiile imune sunt nesemnificativ influențate

## CELULELE SISTEMULUI IMUN

### COMPONENTELE STRUCTURALE ALE CELULELOR EUKARIOTE

Celula este structura organizatorică la nivelul căreia au loc procese metabolice generatoare ale tuturor formelor de viață. Se asigură realizarea reacțiilor biochimice furnizoare de energie necesară exprimării funcțiilor vitale și conservării caracterelor genetice achiziționate de-a lungul unui proces evolutiv al cărui început se pierde în negura erelor biologice.

Atât la organisme inferioare, ca de pildă bacteriile și virusurile, cât și la cele superioare organizate, adică mamiferele, deci atât la celulele prokariote cât și la cele eukariote, există o organizare fundamentală celulară care constă din prezența a trei componente principale, și anume: a) un nucleu, care la bacterii nu este prea bine conturat, la nivelul căruia se află acizii nucleici depozitari ai zestrei genetice;



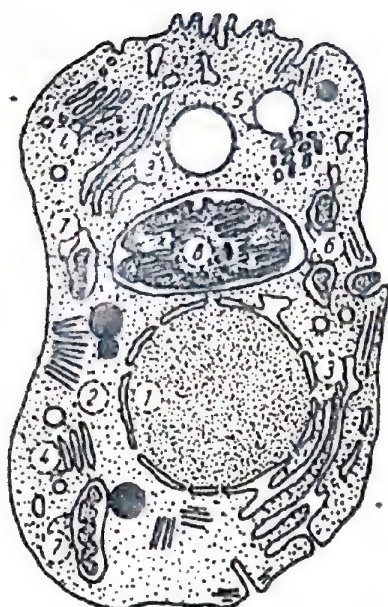


Fig.24. Reprezentarea unei celule eukariote. 1-matricea nucleară; 2-matricea citoplasmatică; 3-reticul endoplasmatic; 4-complex Golgi; 5-vacuole; 6-lizozomi; 7-mitocondrii; 8-cloroplaste (la celule vegetale) (după I.Dinulescu și col.).

b) o citoplasmă, în care există diferite organite celulare, și c) o membrană plasmatică ce separă celula de mediul ambiant (fig. 24).

#### NUCLEUL

Nucleul este constituentul celulei care "guvernează" toată activitatea acesteia. În general, o celulă are un singur nucleu al cărui volum reprezintă cca. 6% din volumul celular. Sunt însă și celule cu nucleu mai mari sau mai mici, deci cu diferite rapoarte nucleu/citoplasmă, celule cu doi sau mai mulți nucleu, cum ar fi neuronii simpatici, osteoclastele, fibrele musculare, unele hepatocite etc., sau chiar celule anucleate, cum este cazul hematiilor la mamifere. De obicei, nucleul este poziționat central și are o formă sferică, deși sunt și celule cu nucleu elipsoidal sau chiar strânsulat, cum este cazul nucleului granulocitelor PMN. La eukariote, nucleul are o membrană periferică alcătuită din două foițe separate între ele printr-un spațiu perinuclear. Această membrană delimitează carioplasma în care, în interfază, se poate pune ușor

în evidență prezența cromozomilor, care sunt sediul ADN.

În nucleul tuturor celulelor există unul sau mai mulți nucleoli bogați în ADN, în ARNt și bineînțeles în ARN-metilază.

#### CITOPLASMA

Citoplasma celulelor eukariote are șase organite principale, "dispersate" într-o masă gelatinoasă (tabelul 14), și anume:

**Citosolul** care conține scheletul celular, de unde și denumirea de "citoschelet". Este partea solubilă a citoplasmei, cu o rețea densă de filamente de proteină, reprezentând cca. 54% din volumul celulei. Aici se găsesc restul organelor celulare și tot aici au loc multe reacții chimice prin care celula metabolizează unele molecule care vor servi ca precursori necesari asigurării structurii, funcției și diviziunii ei. Pentru realizarea acestor funcții biologice, citosolul conține numeroase enzime, nucleotide, hidrați de carbon, acizi grași, aminoacizi etc. De asemenea, conține proteine care dau forma și compartimentarea celulei, asigurându-i coerența mișcărilor.

Este cazul "microtubulilor", niște filamente cu dimensiuni între 6 și 24 nm, al căror conținut proteic major este "tubulina", capabilă să se organizeze spontan *in vitro* în microtubuli care formează partea principală a citoscheletului. În funcție de tipul de celulă, în afară de tubulină mai pot exista, mai mult sau mai puțin reprezentate, și alte proteine, ca de pildă *actina*, care formează filamente mici, adică "microfilamente", *miozina*, care formează filamente mari, *profilina*, care leagă actina C prevenind polimerizarea ei, *tropomiozina* etc.



Componentele citoplasmei (după B. Alberts și D. Bray)

Componentele citoplasmei	Procent din volumul total al celulei	Număr aproximativ/celulă
Citosol	54	1
Mitocondrii	22	1700
Cisternele reticulului endoplasmic	9	1
Cisternele aparatului Golgi	6	-
Lizozomi	1	300
Peroxisomi	1	400

În cazul limfocitelor, un rol important revine *calmodulinei*, care activează fosforilarea lanțului ușor al miozinei, reglează ATP-aza și intervine în reglarea sintezei unor kinaze prin intermediul  $Ca^{2+}$ .

**Mitocondriile** sunt organite celulare capabile să transforme energia de oxidare în energie chimică. Mitocondriile reprezintă cca. 1/4 din volumul total al celulei, fiind separate de citosol prin două foite membranare distincte care pot fi traversate specific sau selectiv de către diverse molecule. Mitocondriile generează majoritatea ATP celular.

**Reticulul endoplasmatic**, locul unde celula își "fabrică" componentele proteice și lipidice, este dotat cu o membrană la nivelul căreia, spre latura citosolică, sunt atașați ribozomii.

La acest nivel există diferite enzime implicate în sinteza lipidelor și proteinelor destinate atât secreției cât și structurării altor organite celulare, inclusiv membranei citoplasmice. Polipeptidele destinate secreției sunt transportate activ prin membrana reticulului endoplasmic către lumenul acestuia după care, așa cum este cazul imuno-globulinelor, ajung în aparatul Golgi, de unde sunt eliminate extracelular, fie sub formă de molecule libere, fie rămânând atașate la suprafața celulei. Multe proteine nu sunt eliberate în lumenul reticulului endoplasmic, lanțurile lor polipeptidice fiind reținute pe suprafața citosolică a membranei acestuia, după care sunt glicozilate și exportate spre lizozomi, peroxizomi, spre membrana nucleului etc.

**Aparatul Golgi** este alcătuit dintr-o sumă de cisterne înconjurată de mici vezicule. Proteinele din lumenul și membranele reticulului endoplasmic sunt transferate prin intermediul unor vezicule de transport în lumenul aparatului Golgi, de unde sunt orientate spre formele moleculare finale, mature funcțional. Aici polipeptidele suferă modificări substanțiale, care constau din desfacerea unor oligozaharide legate prin Asp la nivelul reticulului endoplasmic și eventuala adăugare a altor zaharuri sub controlul unei activități enzimatică complexe.

Proteinele sunt exportate din aparatul Golgi spre destinații intracelulare sau extracelulare, atât prin intermediul veziculelor care înconjoară cisternele acestui aparat, precum și grație receptorilor de la nivelul membranei Golgi care recunosc diferite segmente din lanțul proteinelor ce urmează a fi transportate. Pentru adăugarea glucidelor, în aparatul Golgi acționează secvențial cel puțin trei glicoziltransferaze care folosesc glucidele activate prin legarea la substraturi nucleotidice.



**Lizozomii** sunt specializați pentru digestia intracelulară, motiv pentru care conțin o mare cantitate de enzime hidrolitice active la pH acid. Hidrolazele sunt sintetizate în reticulul endoplasmic și transportate prin aparatul Golgi la lizozomi. Se pare că la hidrolazele lizozomale este atașat un oligozaharid manozo-fosfat, care poate fi recunoscut de către un receptor situat la nivelul aparatului Golgi și care facilitează apoi transportul proteinelor glicozilate.

**Peroxizomii** sunt organite specializate pentru efectuarea reacțiilor oxidative prin generarea de  $H_2O_2$  și degradarea acesteia prin catalazele pe care le conțin.

## MEMBRANA PLASMATICĂ

Membrana plasmatică este un filtru activ care delimitează celula de mediul înconjurător, permițându-i în același timp menținerea unui contact strâns cu elementele acestuia. Ea nu este un simplu perete despărțitor, ci un organism viu și extrem de complex care realizează contactul celulei cu diverși ioni, molecule sau alte celule.

Prin intermediul unor componente glicoproteice cu funcție de receptori pentru diverși liganzi, celula primește informații din afară și le transmite în interior sub forma unor cascade de reacții biochimice care, în fond, sunt adevărate relee biochimice și biologice. Aceste semnale comandă modificări profunde, ca de pildă modificarea celulei sau activarea unor funcții secretorii ale ei care, la rândul lor, pot avea rol de mesageri celulari. Atât membrana plasmatică, care delimitează celula la exterior, cât și celelalte membrane ale organitelor și formațiunilor interne ale celulelor eukariote - adică nucleul, mitocondriile, aparatul Golgi, reticulul endoplasmic - au o structură comună, fiind alcătuite din lipide și proteine legate între ele prin interacțiuni necovalente.

Moleculele de lipide sunt dispuse în două straturi de câte 4-5 nm grosime fiecare, formând un *dublu strat lipidic* care funcționează ca o barieră pentru moleculele hidrosolubile. Acest dublu strat lipidic fluid este format din cca.  $10^9$  molecule, în el plutind proteine hidrofobe rigide care realizează diferite funcții ale membranei, cum ar fi transportul intra- și extracelular al enzimelor sau al altor molecule, exprimarea receptorilor, antigenelor de membrană, a moleculelor de adeziune etc. Toate membranele, atât cea plasmatică cât și cele interne, sunt structuri fluide, dinamice, în care lipidele și în special proteinele se pot deplasa rapid în plan lateral sau vertical.

Mișcările în plan lateral favorizează legarea încrucișată a receptorilor, asocierea lor, transmiterea semnalelor de la exterior spre interiorul celulei etc. Deplasările în plan vertical sunt mai rare, ele favorizând exprimarea sau mascarea unor determinanți antigenici specifici celulei (modulație antigenică).

Fluiditatea lipidică, sau, cum mai este denumită, microviscozitatea, este neomogenă, cu o distribuție neuniformă a componentelor proteice.

După unii, ar exista trei clase diferite de componente ale membranei, care ar ocupa diferite regiuni în planul ei. Ar exista componente de clasa I, care difuzează liber în planul membranei, alcătuind domeniul de tip I ce reprezintă structura fluidă a mozaicului, componente de clasa II, ancorate la microfilamentele din citoschelet care ocupă domenii semifluide contractile de tip II, și componente de clasa III, ancorate la microtubulii citoscheletului care ocupă domeniile III rigide. Deci, componentele mobile și imobile pot coexista la nivelul membranei, fapt care permite deplasarea și internalizarea unor structuri ale acesteia.



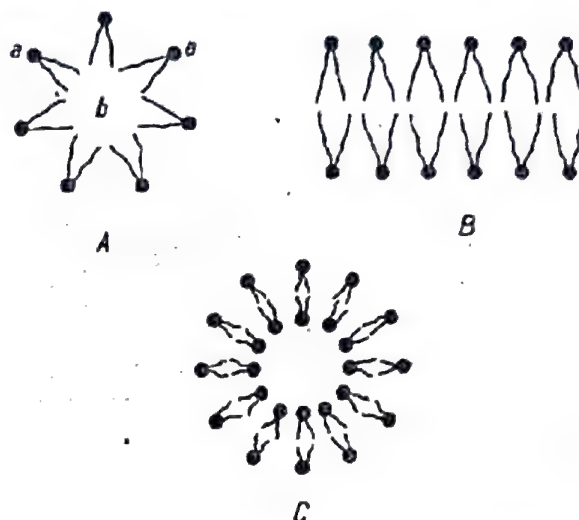
**Lipidele membranei plasmatică.** Prin difracție în raza X s-a putut preciza că moleculele lipidice sunt dispuse în două straturi distincte: unul la exterior, alcătuind fața externă a membranei, și altul la interior, reprezentând fața internă sau citoplasmică a ei. Fosfolipidele, glicolipidele și colesterolul care compun stratul lipidic celular sunt molecule *amfipatice*, cu un "cap" hidrofilic și o "coadă" hidrofobă de 14-24 atomi de C, care reprezintă mai mult de 50% din volumul membranei. În mediu lichid, datorită caracterului amfipatic, formează spontan fie micelii, fie un strat dublu linear sau circular cunoscut sub denumirea de "lipozomi", în care capul hidrofilic este orientat spre exterior iar coada hidrofobă spre interior (fig. 25).

Fig.25. Structura și dispunerea moleculelor de lipide.

A: a-capul hidrofilic; b-coada hidrofobă a moleculei;

B-dispunerea moleculelor sub formă de strat dublu linear;

C-dispunerea sub formă de strat dublu circular (lipozom) (după B. Alberts și D. Bray).



Moleculele își schimbă rapid locul între ele, se rotesc în jurul axului propriu și difuzează lateral, proces care asigură fluiditatea membranei.

La realizarea fluidității mai participă și alți factori ca de pildă lungimea cozii moleculei, conținutul în colesterol, compoziția acizilor grași etc. De exemplu, moleculele cu extremitatea hidrofobă mai scurtă, adică cu un număr mai mic de atomi de C nesaturați, cu duble legături *cis*, realizează membrane cu o fluiditate mai mare, situație în care un eventual avantaj ar fi conferit și de existența unei proporții reduse de colesterol.

În membranele plasmatică ale celulelor eukariote ar exista un raport 1:1 între moleculele de fosfolipide și colesterol, ultimul interacționând cu extremitatea hidrofilă a fosfolipidelor cu rol de "reglator de vîscozitate": previne scăderea fluidității membranei atunci când celula se găsește în mediu cu temperatură scăzută, sau creșterea anormală a ei la temperaturi crescute. Un rol important din acest punct de vedere revine și acizilor grași saturați și nesaturați, proporția dintre aceștia contribuind nemijlocit la menținerea fluidității în limite normale. De exemplu, la organisme poikiloterme, a căror temperatură variază o dată cu temperatura mediului, se înregistrează schimbări în conținutul acizilor grași din membrană, schimbări care mențin fluiditatea acesteia relativ constantă.

Membrana plasmatică a celulelor prokariote conține un singur tip de molecule de fosfolipide și este lipsită de colesterol.

La eukariote există o cantitate mare de colesterol și mai multe tipuri moleculare de fosfolipide, dintre care mai bine cunoscute sunt fosfatidil-colina, fosfatidil-serina, sfingomielina și fosfatidil-etanolamina. Fosfolipidele și colesterolul dețin 95% din totalul lipidelor, restul de 5% revenind glicolipidelor care, la eukariote, derivă dintr-un alcool aminat lung, sfingozina, iar la prokariote, din glicerol. Cea



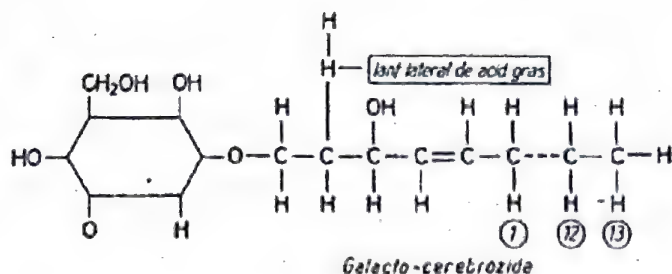


Fig.26. Structura chimică a moleculei de galactocerebrozidă, cu ilustrarea modului de legare a lanțului lateral de acid gras la hidratul de carbon (după B. Alberts și D. Bray).

mai simplă moleculă glicolipidică este *galactocerebrozida* cu capul polar format din galactoză (fig.26), iar cele mai complexe molecule sunt *gangliozele* cu capete polare formate din galactoză, galactozamină sau glucoză, asociate cu una sau mai multe molecule de reziduuri de acid sialic (acidul N-acetil neuraminic sau NANA). Acest reziduu le conferă o sarcină electrică negativă (fig. 27).

Suprafața exterioară a membranei plasmatice este bogată în sfingolipide derivate din ceramidă. Celulele eukariote au peste 300 de tipuri de sfingolipide care participă la numeroase procese biologice fundamentale, cum ar fi proliferarea și diferențierea celulară, transformarea oncogenică, transducția intracelulară a semnalelor etc.

Sfingomieline, o grupare fosforilcolinică atașată printr-o legătură fosfodies-terică la ceramidă, este hidrolizată de către o sfingomielinază neutră a cărei sinteză este stimulată de către vitamina D<sub>3</sub>, lipidele derivate din această hidroliză servind ca modulatori endogeni ai căilor de transmitere a semnalelor în limfocite.

Sfingozina, rezultată din deacilarea ceramidei la atomul de C din poziția 2, inhibă activitatea proteinkinazei C (PKC), influențând astfel procesele biochimice intracelulare.

De altfel, rolul lipidelor de pe suprafața membranei plasmatice este extrem de complex, alterările la acest nivel putând avea uneori consecințe foarte importante asupra întregii funcții a celulei și, implicit, a organului sau țesutului în care se găsesc aceste celule.

**Proteinele membranei** alcătuiesc restul de 50% din volumul ei, reprezentând cel de-al doilea component principal al acesteia. Dacă, volumetric, proteinele membranare se găsesc în proporție aproape egală cu cea a lipidelor, ca număr

de molecule, proporția nu se mai păstrează; dimensiunile unei molecule de proteină fiind mult mai mari, raportul dintre numărul lor și cel al moleculelor de lipide este de cca. 50 : 1.

Proteinele sunt inserate în dublul strat lipidic pe care-l pot traversa de la o suprafață la alta într-o manieră de "tip imunoglobulinic" sau de "tip lectinic" (fig. 28), pot fi implantate la nivelul unui singur strat sau, pur și simplu, pot fi atașate covalent la extremitățile polare hidrofile ale lipidelor sau altor molecule de proteine (fig. 29). Ca și lipidele, moleculele de proteine sunt amfipatice, cu o regiune hidrofobă, care interacționează cu regiunea hidrofobă a lipidelor din interiorul dublului

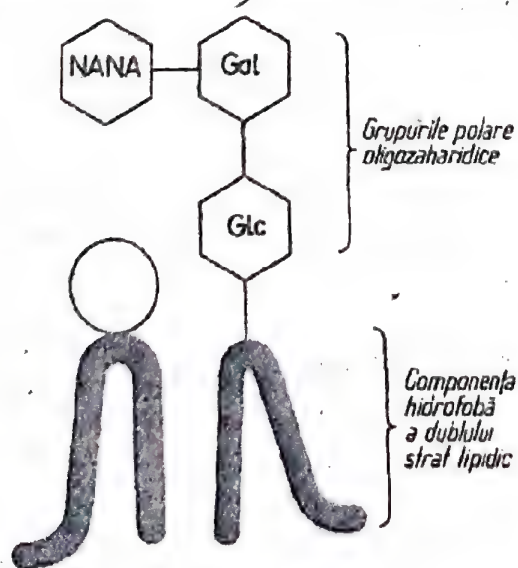


Fig. 27. Structura unei molecule de ganglioizid (după B. Alberts și D. Bray).



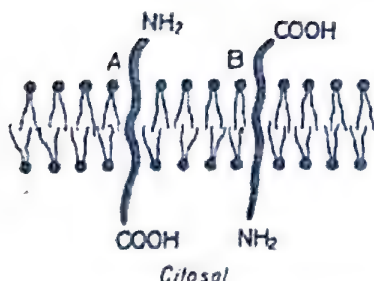


Fig.28. Proteine de "tip imunoglobulinic" (A) și de tip "lectinic" (B). Proteinele de "tip imunoglobulinic" au extremitatea NH<sub>2</sub> terminală situată extracelular, pe când cele de "tip lectinic" au această extremitate implantată în citosol (intracelular).

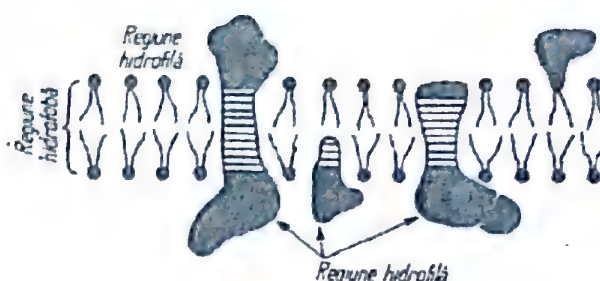


Fig.29. Proteine implantate în dublul strat lipidic al membranei sau numai atașate acestuia (după B. Alberts și D. Bray).

strat lipidic, și alta hidrofilă, expusă la suprafața exterioară și interioară a membranei (v. fig. 29). Aceste două suprafețe ale membranei diferă între ele prin conținutul lipidic și proteic, diferență care-i realizează asimetria funcțională. Se pare totuși că balanța energetică face ca regiunea transmembranară a proteinei de membrană să conțină predominant regiuni hidrofobe cu o structură secundară precisă, de  $\alpha$ -helix, și cu plieri în structuri ternare și cuaternare compacte. Plierea lanțului, formarea  $\alpha$ -helixului și organizarea cuaternară s-ar realiza în două stadii diferite: inițial s-ar forma  $\alpha$ -helixuri stabile, care ar traversa straturile lipidice ale membranei, după care acestea ar interacționa între ele formând proteinele globulare încorporate în stratul lipidic (fig. 30).

O caracteristică importantă a proteinelor membranare, cu profunde implicații biologice, este capacitatea lor de a se lega încrucișat, de a se aglomera sub formă de "pete" sau de puncte difuze și de a se deplasa spre polii celulelor, putând fi eliminate de la suprafața acestora fie prin desprindere, fie prin internalizare. Mobilitatea laterală a proteinelor membranare poate fi însă blocată, ele rămânând relativ fixe în plan orizontal. Această blocare se realizează fie prin agregarea lor sub formă de complexe voluminoase, destul de grele pentru a se mai deplasa, fie prin ancorarea lor la alte structuri ale citosolului sau la proteinele din membrana altor celule (fig. 31).

Ca și lipidele, proteinele membranei plasmatice au mișcări rotaționale în jurul axului propriu, mișcându-se prin difuzie laterală în dublul strat lipidic cu un coeficient de difuziune care realizează între  $10^{-9}$  și  $10^{-12}$  cm<sup>2</sup>/secundă, față de coeficientul de  $10^{-8}$ /secundă al moleculelor de fosfolipide.

Funcțiile de "markeri antigenici", de receptori, sau de suport pentru multe enzime sunt realizate de către proteinele membranei implantate în dublul strat lipidic al ei. Tot aceste molecule sunt implicate în transportul transmembranar al unor compuși diferiți cu greutate moleculară mică.

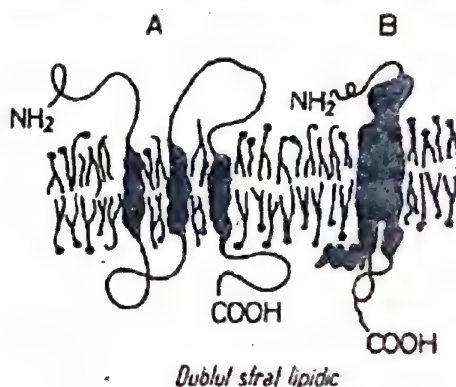


Fig.30. Modul de organizare a proteinei implantată în dublul strat lipidic al membranei plasmatice. Într-o fază inițială, lanțul polipeptidic traversează de mai multe ori stratul lipidic (A). Într-o fază ulterioară, devine o structură compactă, globulară, ca rezultat al formării pliurilor terțiare și cuaternare a lanțului primar (B) (după W. Kanpp și col.).



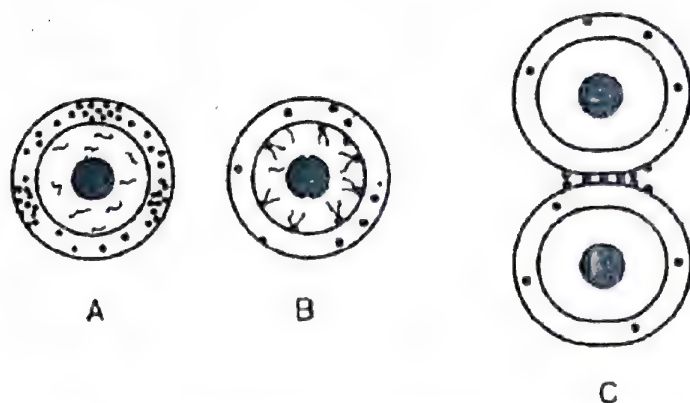


Fig.31. Diferite posibilități de imobilizare a proteinelor din structura membranei plasmatică. A-prin agregare sub formă de complexe voluminoase; B-prin ancorare la citoschelet; C-prin fixare la proteinele de pe suprafața altor celule.

**Hidrații de carbon** se găsesc sub formă de glicoproteine sau glicolipide formate din legarea oligozaharidelor la proteinele sau lipidele membranei. Spre deosebire de lipide, care pot lega un singur zaharid, o moleculă de proteină poate lega mai multe reziduuri de hidrați de carbon (fig. 32). Aceștia sunt expuși numai la suprafața exterioară a membranei, formând *glicocalixul* sau *glicolema*, ne-găsindu-se niciodată pe suprafața ei citosolică. Reprezintă cca. 2-10% din greutatea membranei plasmatică și au rol în legarea și recunoașterea diverșilor liganzi. În componența glicocalixului există cca. 10% din totalul tipurilor de molecule de glucide existente în natură, dintre care cele mai importante sunt manoza, glucoza, fucoza, galactozamina și acidul sialic, acesta din urmă realizând o sarcină electrică negativă.

Este posibil ca aceste oligozaharide, pe lângă rolul lor în relația receptor-ligand pentru unele lectine, să mai participe activ și la fixarea proteinelor la matrița lipidică membranară sau, prin intermediul integrinelor în componența căroră ar putea exista, la unele procese de aderare celulară.

Deși membrana plasmatică este practic impenetrabilă, totuși, funcția ei de barieră este relativă, putând fi traversată de o serie întreagă de ioni, aminoacizi, nucleotide, hidrați de carbon etc. Acest pasaj transmembranar este determinat de către caracteristicile elementelor care traversează membrana, dar și de către proprietățile membranei traversate. Astfel, moleculele mici, liposolubile, polare sau cu o încărcătură slabă de sarcină electrică, traversează ușor membrana în timp ce moleculele mari, polare, sau cele mici dar cu o încărcătură de sarcină

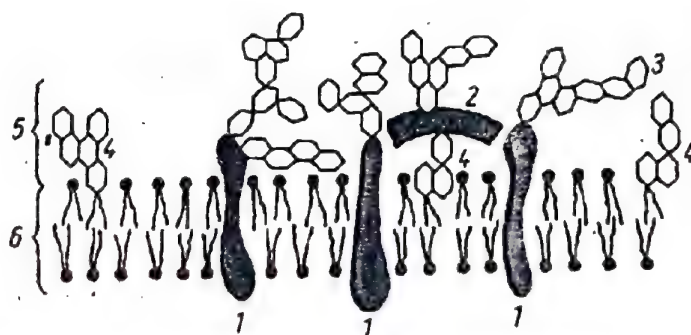


Fig.32. Modul de legare a hidraților de carbon la membrana plasmatică a celulei. Hidrații de carbon, reprezentați sub formă hexagonală, se leagă atât la proteinele cât și la lipidele membranei, formând glicocalixul. La o moleculă de proteine se pot lega mai multe molecule de hidrați de carbon, pe când la o moleculă lipidică se leagă doar o singură moleculă de hidrați. Hidrații de carbon sunt întotdeauna atașați numai la suprafața exterioară a membranei plasmatică.

1-proteine transmembranare; 2-proteine "atașate"; 3-glicoproteine rezultate din combinația proteină+hidrați de carbon; 4-glicolipide (lipide+hidrați de carbon); 5-glicolema sau glicocalixul; 6-dublul strat lipidic al membranei (după B. Alberts și D. Bray).



electrică mare o traversează greu sau deloc (fig. 33). În traversare sunt implicate unele *proteine de transport membranar* care leagă și transportă, fie pasiv, fie specific, diferite clase de compuși biologici. Unele transportă în sistem independent, nefiind condiționate de alte sisteme, în timp ce altele sunt în interdependență funcțională, penetrarea unui compus sau element în interiorul celulei fiind condiționată de părăsirea acesteia de către alt element, ca de pildă în relația  $K^+/Na^+$  unde influxul de  $K^+$  este obligatoriu asociat cu efluxul de  $Na^+$ . Transportul se poate face pasiv, în absența surselor de energie, sau activ, prin energie metabolică furnizată în majoritatea cazurilor de hidroliza ATP ca urmare a legării ei de către proteinele de transport. Unele proteine de transport membranar sunt de fapt enzime care nu modifică integritatea membranei, sau o pot modifica formând canale hidrofobe, un fel de "pori" sau "tunele" prin care moleculele pot circula prin difuziune liberă de la exterior spre interiorul celulei. O mică parte dintre aceste canale sunt deschise în permanență, dar cea mai mare parte a lor se poate deschide sau închide, așa cum se închide sau se deschide o ușă, fie sub acțiunea unui ligand legat la receptorul corespunzător, fie ca urmare a modificării încărcăturii de sarcină electrică.

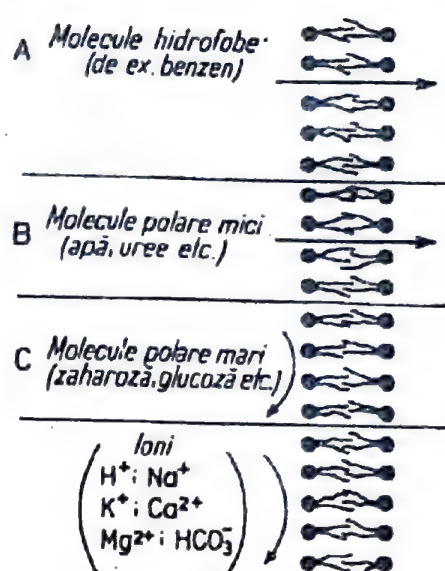


Fig.33. Posibilitatea traversării membranei plasmatică de către diferite tipuri de molecule sau ioni. Dublul strat lipidic poate fi ușor traversat de către moleculele hidrofobe (A) sau polare mici (B). Nu este traversată de către moleculele mari (C) sau ionii cu sarcină electrică mare (D) (după B. Alberts și D. Bray).

Circulația transmembranară poate fi favorizată de ionofori de genul Gramicidinei A, Valinomycinei, A 23187 etc., niște molecule hidrofobe mici care măresc permeabilitatea membranei sau formează pori în dublul strat lipidic al ei. Macromoleculele sau particulele mici, corpusculare, ca de pildă virusurile, bacteriile, fragmentele de celule eukariote sau chiar celulele întregi pot fi endocitate prin pinocitoză în cazul moleculelor solubile, sau prin fagocitoză în cazul fragmentelor sau celulelor bacteriene, eukariote etc., proces descris mai amănunțit la celulele fagocitare și prezentatoare de antigen (APC). Deci, membrana celulară este un mozaic molecular la nivelul căruia au loc procese biochimice complexe, cu rol major în transferul de semnale informaționale.

## CELULA MATCĂ

Toate celulele aflate în circulația sangvină, atât cele cu rol în apărarea imună cât și cele care nu sunt implicate în acest gen de apărare, au o origine comună. Ele descind din celula matcă, cu denumirile sinonime de *sușă* sau, după terminologia anglo-saxonă, *stem* (tulpină). Este o celulă pluripotentă care apare prima în viața embrionară, inițial în insulele sacului vitelin și apoi în țesutul hematopoietic al ficatului embrionar și care, la adulți, este prezentă în măduva oaselor late și chiar în circulație, unde ar fi cca. 2-10 celule matcă la  $1 \times 10^6$  limfocite



imunocompetente. La copii există și în măduva oselor lungi, care însă cu vârsta își pierde funcția hematogenă încărcându-se cu adipocite.

Celula matcă se înmulțește în absența stimulilor exogeni, generând progenitori din care, sub influența factorilor umorali locali, derivă toate celulele aflate în circulație. Morfologic nu poate fi deosebită de limfocitele imunocompetente, singura posibilitate de identificare a ei fiind cea de evaluare a capacității de proliferare *in vitro*, unde formează "colonii" în care există precursori multipli celulari. În linii mari, din colonia multipotențială, cu celule nediferențiate, apărută după diviziunea celulei matcă depozitară a informației genetice, descind diverși progenitori care trec mai întâi prin stadiul de "hemocitoblast".

Atât celula matcă, cât și hemocitoblastul sau descendenții acestuia, respectiv precursorii timpurii care formează coloniile (CFU = unități formatoare de colonii) sunt foarte sensibili la acțiunea radiațiilor ionizante, dar rezistenți la terapia cu citostatice. Așa se face că, în cursul chimioterapiei mielosupresoare, în circulația sangvină se găsește un număr sporit de progenitori hematopoietici sau chiar de celule matcă. Această observație și-a găsit o aplicație practică majoră, sângele periferic de la bolnavii cu leucemie, tratați cu diferite citostatice, în care au rămas nealterate celulele matcă formatoare de colonii, fiind folosit ca sursă regeneratoare de progenitori celulari.

Deci, celula matcă este dotată cu o dublă potențialitate: a) de autoregenerare și b) de diferențiere și generare a populațiilor celulare din circulație. Mecanismele care controlează această dublă potențialitate nu sunt cunoscute, dar se știe că între celula matcă, celulele stromei și diferite citokine se instalează un ansamblu complex de interacțiuni care controlează proliferarea și diferențierea precursorilor celulari derivați din ea. "Celule stromale" este un termen generic care definește celulele țesuturilor fixe, nehematopoietice din cavitatea medulară. În această cavitate sau "stromă", există multe tipuri diferite de celule.

Se pare că hemocitoblaștii au la nivelul membranei lor niște receptori care-i vor angaja pe căi "predestinate" spre locuri unde se vor matura funcțional descendenții lor. La nivelul acestor locuri, de fapt organe limfoide primare, către care sunt orientați, acești progenitori vor găsi condiții de microclimat corespunzător. În realitate, aceste "condiții" sunt realizate, printre altele, de către o serie de molecule, elaborate și parțial cantonate în aceste organe pentru care hemocitoblaștii au receptori de recunoaștere care-i vor călăuzi cu precizie la destinație, datorită unui proces de *ecotaxie*, de "plecare către casă" (gr. *oikos* = casă + *taxis* = mișcare). Ecotaxia este prezentă nu numai la celulele tinere, ci și la limfocitele mature funcțional care recunosc ariile de dependență de la nivelul organelor limfoide secundare.

Astfel, maturarea precursorilor eritrocitari se face sub influența *eritropoietinei*, a celor granulocitari sub cea a *granulopoietinelor*, a limfocitelor *T* în prezența *timopoietinei* etc. Absența acestor factori sau a organelor la nivelul cărora se maturează progenitorii celulari duce la imposibilitatea maturării lor și, implicit, la grave tulburări funcționale, dintre care unele sunt incompatibile cu viața. De exemplu, atimia congenitală face imposibilă maturarea celulelor *T* și, ca atare, abolește toate funcțiile imune, dependente de această clasă de limfocite. Dar aceleași rezultate se constată și în caz de defecte de sinteză a timopoietinei, chiar dacă timusul este prezent. Celulele descendente din "matcă" pot fi lipsite de attribute imune, cum este cazul hematiilor, pot avea funcții de apărare nespecifică, cum este cazul granulocitelor PMN, sau pot avea în exclusivitate funcții de apărare imună, prototipul acestora fiind limfocitul. Deci, din celula matcă plurifuncțională descind diferite tipuri de celule, care aparțin seriilor *eritroidă*, *megakariocitară*, *granulocitară*, *mieloidă* și *limfoidă* (fig. 34).



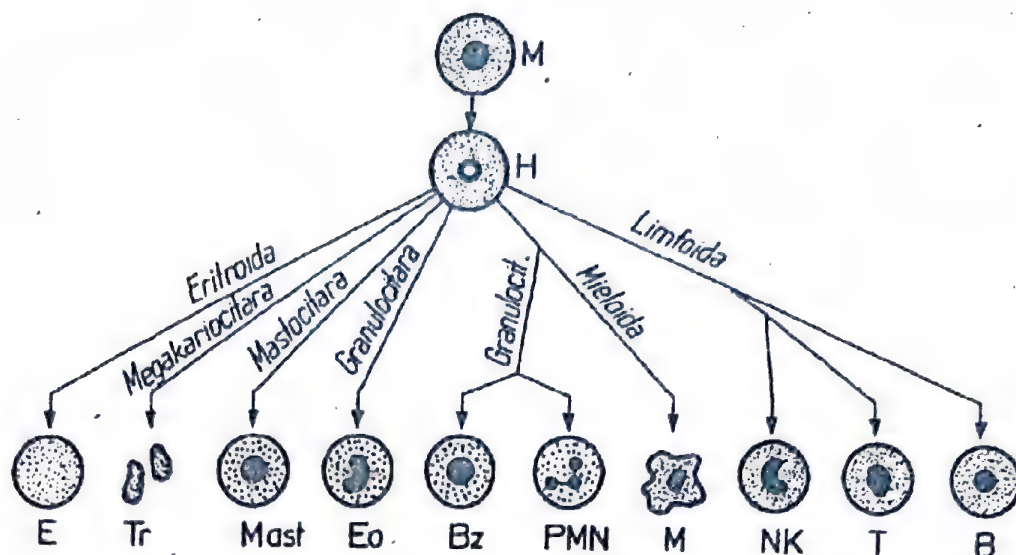


Fig.34. Liniile celulare descendente din celula matcă (M) și hemocitoblast (H). E=eritrocite; Tr=trombocite; Mast=mastocite; Eo, Bz, PMN=granulocite eozinofile, bazofile sau polimorfonucleare neutrofile; M=monocite-macrofage; NK=celule NK; T,B=limfocite T sau B.

## CELULELE SERIEI ERITROIDE

Eritrocitele derivă din eritroblastele descendente din hemocitoblaști. La maturitate au un diametru de  $4-8 \mu$  și sunt încărcate cu hemoglobină formată din *hem*, sau gruparea prostetică, un pigment bogat în ioni de  $Fe^{2+}$  sau  $Fe^{3+}$ , și o componentă proteică denumită *globină*. Rolul esențial al eritrocitelor este acela de a transporta, de la țesuturi și către ele,  $O_2$  și  $CO_2$ .

La om, într-un ml de sânge există cca.  $5 \times 10^9$  hematii, iar în întregul organism, deci la cca. 5 litri de sânge, în jur de  $5 \times 10^{14}$  elemente.

Hematiile trăiesc între 15 și 160 de zile, distrugerea lor făcându-se printr-un proces de *hemoliză fiziologică*, proces care are loc la nivelul splinei.

Nu au rol în procesele de apărare imună. Se pare însă că, cel puțin *in vitro*, ele pot asigura condiții favorabile exprimării unor funcții ale limfocitelor. Astfel, proliferarea policlonală a limfocitelor stimulate *in vitro* cu diverși mitogeni este mai activă atunci când în mediul de cultură se găsesc și hematiile subiectului respectiv, indicele de transformare blastică fiind mai mare în comparație cu cel înregistrat în culturile de limfocite fără hematii. Probabil că prezența lor anulează unele efecte negative exercitate de către pereții vaselor de cultură, în special ai celor refolosite și mai uzate, asupra membranei celulare.

## CELULELE SERIEI MEGAKARIOCITARE

Trombocitele au un rol periferic în apărarea imună. Din matcă, sub influența *trombopoietinei*, derivă megakariocitul care, după mai multe diviziuni rapide se transformă în decurs de cca. 24 de ore în trombocite cu funcții majore în coagularea sângelui. Trombocitele aderă la nivelul leziunii vasculare și eliberează factori care concură la transformarea fibrinogenului în fibrină.



Sunt bogate în amine vasoactive de genul histaminei, serotoninei etc., pe care le eliberează în cantități mari în circulație. Participă la instalarea hipersensibilității imediate de tip I mediată prin anticorpi IgE, responsabilă de creșterea permeabilității capilarelor și contractarea mușchilor netezi ai bronhiilor, uterului etc.

Stimulate cu ionoforul de  $\text{Ca}^{2+}$  A 23187, cu trombină sau collagen, eliberează *factorul de agregare a trombocitelor* (PAF), un potent mediator lipidic care acționează asupra lor după legarea la un receptor cuplat cu inozitol-fosfolipid-fosfodiesterază. Acest factor, care din punct de vedere chimic este 1-O-alkil-2(R)-acetyl-SN-glicerol-3-fosforilcolină, este în mare parte responsabil de generarea fenomenelor menționate mai sus, inclusiv de tromboza arterială, de șoc endotoxic, boli alergice acute etc. În afară de trombocite, el mai este eliberat și de către leucocitele PMN; monocite, macrofage, mastocite, eozinofile etc., stimulate cu zimozan, IgE, ionofori etc.

Procesele inflamatorii generate creează condiții improprii de viață paraziților sau bacteriilor, protejând nespecific organismul de agresiunea lor. Prin efectul său regulator asupra producției de IL-1 și IL-2, trombocitele participă indirect la procesele de apărare imună; la concentrații picomolare PAF stimulează sinteza de IL-1, pe când la concentrații mai mari, micromolare, o inhibă. De altfel, funcțiile trombocitelor sunt mai complexe. De pildă, la ființele aflate pe o treaptă inferioară de evoluție filogenetică, chiar și la păsări, ele ar avea și funcții fagocitare.

## CELULELE SERIEI GRANULOCITARE

Granulocitele asigură "prima linie de apărare" a organismului față de bacterii, fungi, virusuri și paraziți. Ele reprezintă cca. 50-70% din totalul leucocitelor circulante, în condiții normale existând între  $4 \times 10^6$  și  $8 \times 10^6$  celule/ml de sânge. Sunt localizate în țesuturi, prezența lor în circulație fiind efemeră. O celulă, după ce a părăsit torrentul circulator și a pătruns în țesuturi, nu mai revine în circulație.

Pe baza caracterelor morfologice, funcționale și de afinitate tinctorială, granulocitele pot fi împărțite în trei populații distincte a căror maturare funcțională este controlată de către granulopoietine diferite, dar care au o greutate moleculară identică (40-45 kD): a) *eozinofilele*, care descind direct din seria granulocitară, b) *bazofilele* și c) *neutrofilele*, care descind dintr-o linie granulocitară derivată din seria mieloidă, cu un număr mai mare de faze de maturare, fapt care ar sugera apariția lor mai târzie în cursul evoluției filogenetice.

În cursul maturării lor, bazofilele și neutrofilele trec succesiv prin fazele mieloblast → promielocit → mielocit → metamielocit → granulocit segmentat.

## EOZINOFILE

Granulocitele eozinofile sunt celule relativ mari, cu diametrul de 10-15  $\mu$ , cu un nucleu bilobat și cu o citoplasmă cu granulații corpusculare de culoare portocalie bogate în fosfatază acidă, glicuronidază, catepsină, ribonuclează etc., cunoscute și sub denumirea de "granulații eozinofile".

Granulocitele se formează în măduva osoasă, de unde trec în țesuturi ca o populație eterogenă, cu subpopulații celulare cu densități diferite: "normodense" la subiecții normali și "hipodense" la hipereozinofilicii cu boli alergice sau cu unele infecții parazitare.



Se deosebesc de granulocitele PMN nu numai prin granulațiile lor, dar și prin distribuția lor predominant tisulară (doar 1% se află în circulație), prin receptorii de pe membrana plasmatică și în special prin asocierea lor la infecțiile parazitare, la reacțiile inflamatorii cronice și la manifestările alergice.

Aceste celule fagocitează bacterii, fungi și în special complexe antigen-anticorp, contribuind la diminuarea efectelor negative ale acestora. Au un aparat Golgi dezvoltat, numeroase mitocondrii, iar la nivelul membranei, receptori Fc prin intermediul cărora realizează atât fagocitoza complexelor antigen-anticorp, cât și citotoxicitatea anticorp-dependentă, salutară în protecția organismului față de unii paraziți cum ar fi *Schistosoma mansoni*.

La adulți, sunt produse în măduva osoasă și reprezintă cca. 3-6% din totalul populației granulocitare. Numărul lor însă, atât în țesuturi cât și în circulație, poate fi modificat în cursul infecțiilor parazitare, bolilor neoplazice sau proceselor idiopatice. Prezența eozinofilelor în cantitate mare într-un anumit loc din organism indică o reacție locală inflamatorie. De exemplu, în infecțiile cu helminți există o pronunțată eozinofilie intestinală, iar în jurul metazoarelor se pot forma chiar granuloame eozinofilice.

Localizarea lor tisulară este sub controlul limfocitelor *T* care eliberează mediatori umorali cu acțiune directă asupra depozitului de eozinofile din măduvă. Este cazul EO-GSF (factorul de stimulare a creșterii eozinofilelor) și EO-CSF (factorul de stimulare a coloniilor de eozinofile). Tot limfocitele *T* ar elibera și un "factor de diferențiere a eozinofilelor" (EDF), prezent în serul celor cu infecții parazitare, care stimulează geneza și maturarea precursorilor lor. Unii susțin că granulocitele eozinofile sunt descendente directe ale seriei granulocitare.

După alții, se pare că ar exista un progenitor comun din care ar descinde atât eozinofilele cât și bazofilele. Sub influența factorilor eozinopoietici secretați de către diferite subpopulații de limfocite *T*, în special de către limfocitele *T* supresoare și a IL-1 și IL-2, are loc proliferarea și maturarea lor. De fapt, limfocitele *T*s pot activa *in vitro* și multiplicarea neutrofilelor și macrofagelor. Diferențierea lor este sub controlul unor citokine, dintre care mai cunoscute sunt IL-3, IL-5, GM-CSF, rol foarte important revenind IL-5. Ca și granulocitele PMN, eozinofilele exprimă pe suprafața lor molecule de adeziune ( $\beta_2$ -integrine, LFA-1, Mac-1) și receptori pentru selectine. Factorul de aglutinare a trombocitelor (PAF) și componenta C5a a complementului sunt chemoatracți pentru aceste granulocite.

Aceste celule conțin diferite proteine, ca de pildă "proteina de bază majoră" (MBP), peroxidaze, proteine cationice, neurotoxine, lizofosfolipaze etc. La nivelul membranei au antigene și receptori a căror exprimare este în mare măsură condiționată de activarea celulei (tabelul 15). De exemplu, receptorii Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII, Fc $\epsilon$ RI, IFN $\gamma$ , IL-2R sunt slab exprimați pe celulele neactivate, dar foarte intens pe cele stimulate. După activare, în special prin IgE, eozinofilele secretă proteine granulare, proces complex care în unele evenimente poate avea loc în câteva secunde iar în altele, în câteva ore. Secretă de pildă PAF (factorul de aglutinare a trombocitelor) care stimulează eliberarea de O $_2$  și are efecte autocrine, fiind unul dintre cele mai importante semnale activatoare pentru aceste celule. Activarea lor ar fi rezultatul fosforilării proteinelor și în special a tirozinei, cu rol reglator în transmiterea semnalelor.

Exprimarea glicoproteinei 120 (gp 120) pe suprafața eozinofilelor, glicoproteină cunoscută ca fiind receptor pentru HIV pe limfocitele *T* umane, sugerează posibilitatea funcționării acestor celule ca adevărate rezervoare de virus în organismul infectat.



**Exprimarea unor molecule și receptori pe membrana eozinofilelor  
activate sau aflate în repaus**

Denumirea moleculei sau a receptorului	Structura recunoscută de către receptor
Receptorul <i>FcγI</i> ( <i>FcγIR</i> )	Fragmentul cristalizabil al moleculei de IgG (monomer)
Receptorul <i>FcγII</i> ( <i>FcγIIR</i> )	Fragmentul <i>Fc</i> al IgG polimer
Receptorul <i>FcγIII</i> ( <i>FcγIIIR</i> )	Fragmentul <i>Fc</i> al complexelor de IgG
<i>FcεR</i>	Fragmentul <i>Fc</i> al IgE
Receptorul <i>FcαR</i>	Fragmentul <i>Fc</i> al IgA
Receptorul <i>FcμR</i> (?)	Fragmentul <i>Fc</i> al IgM
Receptorul pentru interferon	Interferonul $\gamma$ (IFN $\gamma$ )
Receptorul pentru complement (tip I)	Componenta C3b a complementului
Receptorul pentru complement (tip 3)	Componenta C3b inactivată a complementului (iC3b)
Glicoproteina 120 (gp120)	Virusul imunodeficienței umane (HIV)
Receptorul pentru IL-2 (IL-2R)	Lanțul $\beta$ al moleculei de IL-2
Receptorul pentru IL-3	Interleukina-3 (IL-3)
Receptorul pentru IL-5	Interleukina-5 (IL-5)
Receptorul pentru histamină	Histamina
Receptorul pentru estradiol	Estradiolul
Receptorii pentru glicocorticoizi	Glicocorticoizii
Receptorii pentru leucotriene	În special leucotriene B <sub>4</sub> (LTB <sub>4</sub> )
Receptorul pentru ECF-A	Factorul chemotactic al anafilaxiei
Receptorul pentru VLA-6	Integrina VLA-6
Molecula de adeziune LFA-1	ICAM (molecule de adeziune intercelulară)
Molecule de adeziune MAC-1	ICAM-1; iC3b
Integrinele VLA-4	Fibronectina
Moleculele de adeziune la celulele vaselor (VCAM-1)	Celulele endoteliilor vasculare

Prin degranulare, eozinofilele eliberează diferite enzime și în special MPB (proteina bazică majoră) care poate leza o varietate de celule, fiind principala proteină efectoră a lor, EPO (peroxidaza eozinofilelor) care lezează direct țesuturile, EDN (neurotoxină derivată din eozinofile), toate activând eliberarea de histamină de către mastocite, iar unele dintre ele având chiar și efecte citotoxice (tabelul 16).



Caracteristicile unor mediatori secretați de către eozinofile

Mediatorul	Denumirea completă	Principalele caracteristici fizico-chimice și funcții biologice
ECF-A	Eosinophil chemotactic factor to anaphylaxis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sunt identificate două peptide acide cu greutate moleculară de 360-100 D:               <ul style="list-style-type: none"> <li>a) Val-Gly-Ser-Glu</li> <li>b) Ala-Gly-Ser-Glu</li> </ul> </li> <li>- Activitate chemotactică și chemocinetică</li> </ul>
ECP	Eosinophil cationic protein	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O familie de molecule bazice cu 21 de reziduuri de Arg și greutatea moleculară de 16-20 kD care leagă <math>Zn^{2+}</math></li> <li>- Reprezintă cca. 30% din conținutul granulelor</li> <li>- Se găsește sub formă de precursor care-și definitivează structura în timpul secreției</li> <li>- Nu are activitate bactericidă, dar este citotoxică pentru <i>Schistosoma mansoni</i></li> </ul>
MBP	Major bazic protein	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Polipeptid cu greutatea moleculară de 9300 D, bogat în Arg</li> <li>- Reprezintă mai mult de 50% din proteinele granulare</li> <li>- Omoară larvele de <i>Schistosoma mansoni</i>, <i>Trichinella spirallis</i>, <i>Trypanosoma cruzi</i></li> <li>- Provoacă leziuni ale epiteliului</li> </ul>
EP-X	Eosinophil protein X	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neurotoxină puternică (ca și EDN=eosinophil derived neurotoxin)</li> <li>- Greutatea moleculară 18,4 kD</li> </ul>
EPO	Eosinophil peroxidază	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O glicoproteină formată din cel puțin două subunități cu greutate moleculară între 15-50 kD</li> <li>- Ar modula reacțiile de hipersensibilitate și antiparazitare.</li> </ul>

"Proteina bazică majoră" (MPB) este o proteină cationică capabilă să lege și să inactiveze heparina, responsabilă de dermatita atopică în alergია alimentară, ca urmare a lezării epiteliului gastro-intestinal, sau de lezarea epiteliului bronșic și de patologia asociată astmului bronșic cronic. Rolul ei în reacțiile alergice ar fi expresia potențialului de neutralizare a heparinei. La pacienții cu infecții helmintice, cu astm bronșic sau cu sindrom hiper-eozinofilic, apar în circulație celule cu densitate și funcții diferite de cele existente la subiecții normali. Aceste celule exprimă un număr mai mare de receptori *Fc* și receptori pentru complement, au mai puține granule, probabil datorită degranulării parțiale, produc cantități mai mari de  $O_2$ , au mai multă fosfatază acidă lizosomală și sunt mult mai eficiente în funcția lor citotoxică antiparazitară.

Pentru aceasta, ele și precursorii lor sunt activate de către leucetriena  $LTB_4$  secretată de neutrofile, de ECFA-A și PAF eliberate de mastocite precum și de către diverși factori secretați de limfocitele *T*. De altfel, există o cooperare și o



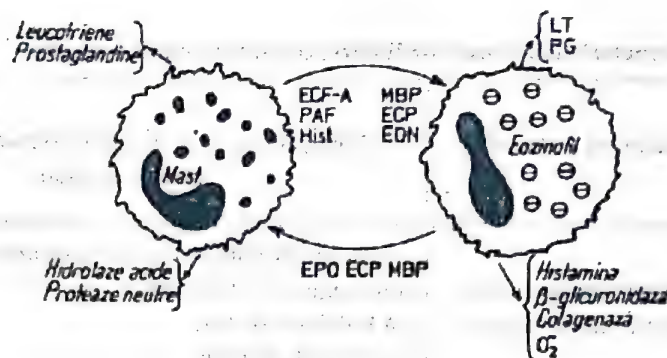


Fig.35. Relații funcționale stabilite între mastocite (Mast) și eozinofile. ECP=proteina cationică a eozinofilelor; EDN=neurotoxina derivată din eozinofile; EPO=peroxidaza eozinofilelor; H=histamina; MBP=proteina bazică majoră; PAF=factorul de agresare a trombocitelor. Mastocitele și eozinofilele se influențează reciproc la locul inflamației, eliberând mediatori solubili care vor provoca leziuni tisulare (după D.D.G.Lee și col.).

influențare reciprocă între eozinofile și mastocite (fig. 35) sau între acestea și diferite alte celule, în urma cărora are loc diferențierea precursorilor și eliberarea mediatorilor de către eozinofilele mature.

În afară de activarea prin produsele altor celule, eozinofilele pot fi activate și de către complexe imune, în special de acelea în care anticorpii s-au fixat pe suprafața parazitului. În astfel de situații, ele se fixează prin receptorul *Fc* la imunoglobuline și eliberează mediatorii care vor ucide parazitul sau vor activa peristaltismul intestinal. De asemenea, IgE citofilic legat la receptorul *Fc* (*FcR*) poate fi activat de către antigen și la rândul său poate activa celula, care va induce prin produsele sale de secreție starea de hipersensibilitate.

În concluzie, se poate afirma că eozinofilele sunt celule efectoare cu rol major în hipersensibilitatea dependentă de moleculele de IgE care le induc eliberarea de PAF, EPO etc., dar care au și funcții reglatorii în acest tip de hipersensibilitate, în special prin influența lor asupra eliberării histaminei de către mastocite și bazofile. Totodată, au efecte citotoxice asupra unor celule epiteliale de la nivelul endoteliilor, traheei sau bronhiilor și sunt principalele celule efectoare ale citotoxicității mediate celular anticorp-dependente (ADCC) în unele parazitoze.

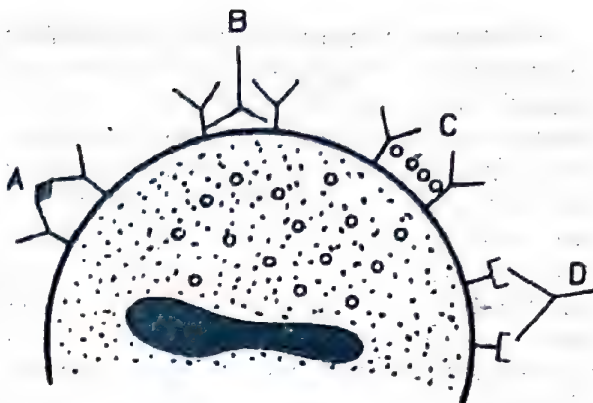
## BAZOFILE

Granulocitele bazofile se diferențiază și se maturează în măduva osoasă de unde ajung în circulația sangvină, fără a cantona în țesutul conjunctiv. Sunt celule cu un nucleu bilobat, cu cromatină periferică densă, cu granule mari de culoare violet-închisă, care maschează nucleul. Au funcții fagocitare reduse, intervenind în special în procesele de apărare imună nespecifică, de tip inflamator, cu referire specială la reacțiile anafilactice ale hipersensibilității de tip imediat. Conțin lizofosfolipide, fiind din acest punct de vedere similare biochimic cu eozinofilele. Sunt bogate în glicozo-aminoglicani, dar lipsite de heparină.

Pe suprafața membranei lor au între 6 000 și 600 000 de receptori pentru IgE care leagă aceste molecule cu înaltă afinitate ( $10^{-9}$  -  $10^{-10}$  M<sup>-1</sup> constanta de echilibru). Legarea la acești receptori este urmată de *degranularea bazofilelor*, un proces biologic în cursul căruia sunt eliminați mediatorii activi. De asemenea, au receptori pentru *Fc* a IgG și pentru fragmentul C3b al complementului, cu rol

Fig.36. Diferite posibilități de legare încrucișată a receptorilor pentru moleculele de IgE care să inducă activarea funcțională a bazofilelor și implicit degranularea lor.

A-legare prin antigen polivalent; B-legare prin anticorpi anti-moleculele de IgE atașate citofil la membrana celulară; C-legare prin lectine; D-prin anticorpi anti-receptori pentru IgE.



important în declanșarea eliberării unor mediatori responsabili de fenomene de hipersensibilitate.

Degranularea, adică eliberarea extracelulară a conținutului granulelor bogate în histone, peroxidază, dehidrogenază, histidin-decarboxilază, acid mucopolizaharidic etc., este un proces fiziologic complex care necesită atât legarea alergenului la receptor, cât și "aglomerarea" receptorilor. Această aglomerare provoacă o schimbare conformațională la nivelul membranei plasmatică care activează sistemele enzimatice intracelulare, culminând cu eliminarea mediatorilor hipersensibilității de tip imediat, fenomen întâlnit și la mastocite și eozinofile. În linii mari, există diferite modalități de activare a acestor celule, toate având însă la bază legarea încrucișată (aglomerarea) a doi sau mai mulți receptori. Aceasta se poate realiza prin unirea a doi receptori *Fc* pentru IgE de către anticorpii anti-IgE, prin lectine etc. (fig. 36).

Legarea încrucișată a receptorilor este urmată de o serie de evenimente biochimice în care cAMP joacă un rol reglator crucial. Unirea receptorilor activează fie o serin-esterază, fie o protein-kinază dependentă de cAMP. Acestea, la rândul lor, activează diverse transferaze care vor controla metilarea fosfolipidelor membranei, însoțite de perturbarea și deschiderea canalelor de  $Ca^{2+}$ . Odată canalele deschise, are loc influxul ionilor de  $Ca^{2+}$ , care se menține atât timp cât antigenul este prezent la nivelul receptorilor, ionii de Ca extracelular și ATP constituind sursele majore de energie ale celulei. În stadiul următor,  $Ca^{2+}$  activează o enzimă, fosfolipaza  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>), care catalizează hidroliza acizilor grași și eliberarea acidului arahidonic, precursor al leucotrienelor, prostaglandinelor și lizofosfatidil-colinei, care ar facilita procesul de degranulare.

Acest proces este specific, iar intensitatea eliberării corelează cu intensitatea manifestărilor clinice, fiind folosit ca test *in vitro* pentru diagnosticul alergiilor.

#### NEUTROFILE POLIMORFONUCLEARE (PMN)

Reacțiile inflamatorii acute se caracterizează prin aflux leucocitar, edeme și eliberare de mediatori solubili. Caracteristica majoră a inflamației este infiltrarea leucocitară, care debutează cu afluența granulocitelor și în special a granulocitelor PMN atrase aici de către factorii chemotactici eliberați, probabil, inițial de către agentul străin pătruns în intimitatea țesuturilor, cum ar fi bacteriile, virusurile, paraziții și de către mastocite, iar apoi și de către alte celule. În general granulocitele și în special cele PMN joacă un rol important în distrugerea microorganismelor, fiind implicate în procese inflamatorii acute și cronice, cum este cazul unor boli autoimune. În acest scop, ele sunt înzestrate cu o mare capacitate de recepție a stimulilor chemotactici, cu o mare mobilitate și cu funcții fagocitare foarte active.



Sunt celule cu un nucleu segmentat, cu 2-6 lobi uniți prin filamente subțiri de cromatină și granulații punctiforme fine, de culoare brună. Aparțin seriei granulocitare cu derivație din seria mieloidă, evoluția lor de la descendentele celulei matcă trecând prin stadii de precursori mieloblaști promielociți și mielociți, implicând 3-4 diviziuni celulare în decurs de 7 zile. În alte 7 zile, realizează forma segmentară, matură, zilnic ajungând în circulație cca.  $1,5 \times 10^9$  celule/kg greutate vie, din care o parte circulă liber iar altă parte aderă la suprafața endoteliilor vaselor mici, formând așa-zisa *populație marginală*, care împreună cu *populația circulatorie* alcătuiesc doar 6% din totalul neutrofilelor, restul fiind cantonate în țesuturi sau aflându-se sub formă de precursori în mitoză. Acest "atac" asigură în permanență necesarul de celule pentru populația marginală, deoarece aceasta migrează continuu în țesuturi, migrare aflată sub influența unor factori chemotactici.

Neutrofilele sunt celule cu viață scurtă: în mod normal se găsesc în circulație cca. 12 ore, după care trec în țesuturi unde stau cantonate timp de 2-4 zile, fiind înlocuite cu altele tinere. Această populație granulocitară se caracterizează printr-o dezvoltată capacitate de locomoție, o mare capacitate de aderare la suprafețe și un bogat echipament de enzime lizozomale care pot "arde" materialul fagocitat.

Odată ajunsă în circulație, aderă la endoteliul peretelui vascular, pe care-l traversează grație posibilității de a se "strecura" printre celulele pereților vaselor, cu ajutorul pseudopodelor emise ca urmare a atracției "chemotactice" exercitată de către factorii chemotactici eliberați de bacterii, alte celule vii, sau de către celulele necrozate. Au o capacitate de locomoție rapidă datorită unor microfilamente contractile formate din actină și miozină, care polimerizează atunci când factorii chemotactici se fixează la nivelul receptorilor de membrană. Factorii care determină abilitatea circulatorie a lor nu sunt complet cunoscuți, dar faptul că PMN pot traversa capilare care au un diametru mai mic decât ele dovedește că aceste celule trebuie să se "deformeze" pentru a realiza traversarea. Dacă nu se deformează, ele rămân cantonate în vase pentru o perioadă variabilă de timp. Aceasta se întâmplă când au ajuns la locul procesului infecțios unde "deformabilitatea" lor scade, ele nemaiputând părăsi locul de "sechestrare". Întregul proces este determinat de modificările în organizarea actinei citoscheletului celular și, deci, de modificările proprietăților mecanice ale celulei (fig. 37).

Actina, o proteină prezentă în citoplasma tuturor celulelor, este componenta majoră a microfilamentelor. Se găsește sub două forme, una globulară denumită și "actina-G", și alta filamentoasă sau "actina-F". Ca răspuns la diferiți factori chemotactici, au loc rapid conversia actinei-G în actină-F și polimerizarea filamentelor de actină, implicate în diferite funcții celulare cum ar fi chemotactismul, secreția de granule, mobilitatea receptorilor de membrană etc. Polimerizarea filamentelor de actină este un proces reversibil și localizat într-o anumită regiune a celulei, în special în aria cu activitate locomotorie mare, adică acolo unde se

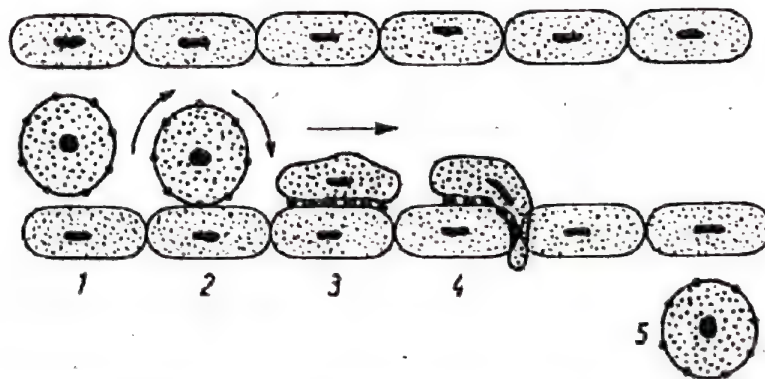


Fig.37. Diferite momente ale circulației granulocitelor PMN intra- și extravascular.

emit pseudopode. Atașarea la suprafețele solide este o condiție *sine qua non* a locomoției: după ce au aderat, celulele proiectează o porțiune a lor – un "protopod" – în direcția semnalului chemotactic, în timp ce capătul ei opus rămâne atașat la suport (celule endoteliale), atașare realizată grație unor diverse molecule de adeziune prezente pe membrana PMN sau pe celulele endoteliale (tabelul 17). Ar fi o succesiune de evenimente biochimice în care ar intra în scenă diferite enzime și molecule de adeziune.

Tabelul 17

Molecule de adeziune cu rol în aderarea granulocitelor polimorfonucleare la endoteliul vascular

Familia	Moleculele	Unele caracteristici ale lor
P-Selectine	GMP-140	-Exprimate permanent pe celulele endoteliale
	CD 62	- Constituenți ai membranei PMN
E-Selectine	ELAM-1	- Exprimate pe celulele endoteliale numai după inducerea sintezei lor
L-Selectine	LAM-1 LECAM-1	- Constituenți ai membranei PMN
Integrine	Mac-1 LFA-1	- Exprimate pe granulocite și monocite-macrofage

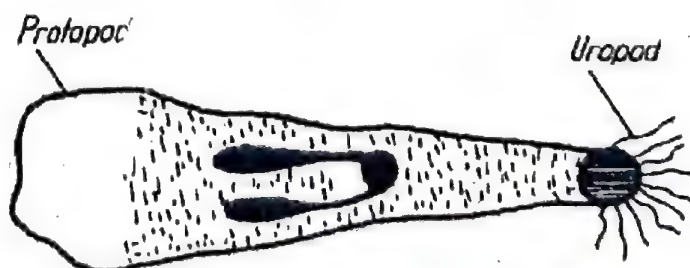
În linii mari, evenimentele s-ar desfășura în felul următor:

1. Inițial, prin L-selectine, granulocitele PMN se leagă la membrana celulelor endoteliale. Această legare este slabă, așa că, sub acțiunea curentului sanguin, PMN "rulează" pe suprafața endoteliului vascular.

2. Sub acțiunea unor atractanți, cum ar fi NAP-1/IL-8 (neutral atractant activation protein-1 și interleukina-8), se modifică forma celulelor atașate, acestea suferind o rapidă activare însoțită de exprimarea lanțurilor  $\alpha$  și  $\beta$  (CD11/CD18) ale integrinelor. Acestea realizează oprirea rulării și adeziunea fermă a PMN la endoteliu.

3. NAP-1/IL-8 de pe suprafața endoteliului "rade" L-selectinele, modifică forma celulelor, făcându-le apte să traverseze peretele vascular. Prin intervenția în secvențe diferite a unor semnale asupra microfilamentelor de actină și asupra moleculelor de adeziune, PMN aderă alternativ cu un pol sau altul al celulei, contractându-se în direcția protopodului, moment în care celula trece de la forma rotundă, apropiind extremitatea posterioară fixată la endoteliu, adică "uropodul", de "protopod", după care urmează îndepărtarea protopodului și alungirea ei și așa mai departe (fig. 38). Deplasarea acestor celule se face într-o manieră similară celei cunoscută la lipitori (*Hirudo medicinalis*).

Fig.38. Fixarea la suprafețe solide și deplasarea granulocitului PMN. Cu ajutorul protopodului, celula se fixează la o suprafață. După fixare, își desprinde uropodul și-l aduce în apropierea protopodului, fixându-l la țesut; desprinde protopodul, celula extinzându-se, în felul acesta "înaintând" spre direcția semnalată de factorii chemotactici.





Microorganismele pătrunse în intimitatea țesuturilor, sau complexe antigen-anticorp formate local emit semnale chemotactice, prezența lor fiind imediat sesizată de către PMN care se deplasează activ în direcția lor.

Se cunosc trei clase diferite de compuși cu activitate chemotactică pentru neutrofile:

- a. *Anafilatoxina C5a* care se formează *in vivo*;
- b. fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanină) și analogii ei;
- c. Leucotriena B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), care este unul dintre cei mai potenți mediatorii ai inflamației și care poate provoca deplasarea PMN spre locul agresiunii, degranularea lor și generarea speciilor active de oxigen.

Recunoașterea și fagocitarea materialului străin, în special a bacteriilor dar și a celulelor mai mari cum ar fi eritrocitele etc. se face direct sau prin "opsonine", care sunt de fapt molecule de IgG sau de complement. Când particula care urmează a fi fagocitată s-a atașat la suprafața membranei plasmactice, granulocitul PMN emite pseudopode care o înconjoară, prin fuzionarea acestora particula fiind înglobată într-o vacuolă denumită *fagozom*.

Granulele citoplasmei, bogate în proteine cu activități antimicrobiene, sintetizate încă din stadiile timpurii ale diferențierii celulare, se deplasează și fuzionează cu fagozomul, descărcându-și rapid și masiv conținutul lor toxic. Neutrofilele umane conțin două tipuri diferite de granule care se formează în stadii diferite de maturare celulară.

Încă din stadiul de promielocit se formează "granulele azurofile" bogate în peroxidaze, o celulă matură conținând cca. 1 000 de astfel de granule. În fazele timpurii ale maturării celulare, peroxidaza este prezentă nu numai în granule, care constituie locul final de depozitare a ei, ci și în reticulul endoplasmic rugos, unde este sintetizată, și în aparatul Golgi, unde este "împachetată".

În mielocite, un stadiu ulterior de maturare, apar "granulele specifice" sau "secundare", cele azurofile fiind mai puține numeric. Echiparea PMN cu arsenalul enzimatic are loc în cursul maturării lor. Odată maturată, celula își pierde mașinăria necesară sintezei, căpătând în schimb caracteristicile esențiale funcțiilor ei viitoare: capacitatea de a răspunde la semnale chemotactice, mobilitate și funcții fagocitare. Cele două tipuri de granule diferă ca mărime, putând fi separate prin fracționări subcelulare, conținutul lor diferind complet, cu excepția lizozimului prezent atât în granulele azurofile cât și în cele secundare sau în alte organele mici de depozitare (tabelul 18).

Granulele azurofile conțin o serie de enzime litice de genul hidrolazelor acide caracteristice lizozomilor, proteazelor serice cu pH neutru, lizozimului și mieloperoxidazei, o enzimă nehidrolitică etc. Acest tip de granule este implicat atât în uciderea bacteriilor cât și în digestia intracitoplasmatică a materialului fagocitat. Granulele specifice conțin collagenaze, lizozim, lactoferină și proteine care leagă vitamina B<sub>12</sub> al căror rol biologic este încă puțin cunoscut. O a treia populație de granule este formată din particule subcelulare de depozitare, de dimensiuni mici, eterogene ca structură, conținând unele hidrolaze acide, o mare parte din catepsinele B și D și proteinaza 3; o serin-protează care este prezentă și în granulele azurofile. O localizare exclusivă la acest nivel are gelatinaza, o metalo-proteinază cu multiple funcții biologice.

Uciderea bacteriilor fagocitate depinde de activarea enzimelor granulare și a NADPH-oxidazei, urmată de eliberarea moleculelor toxice de oxigen.

Datorită funcțiilor fagocitare foarte active și posibilităților mari de distrugere prin mecanisme oxigen-dependente și independente ale materialului înglobat, neutrofilele joacă un rol important în procesele oxidative și de "curățire", fiind considerate pe nedrept "gunoierii organismului". Rolul lor în organism este mult mai complex.

Localizarea subcelulară a enzimelor și a unor constituenți depozitați în neutrofilele umane  
(după M. Bagglioni și col. și R. Lehrer și col.)

Clasa constituenților	Granule azurofile	Granule specifice	Organite mici de depozitare
Enzime microbicide	Mieloperoxidaze Lizozim	Lizozim	
Proteinaze neutre	Elastaze Catepsina G Proteinaza 3 Colagenaza	Colagenaze Gelatinaze	Gelatinază Activator de plasminogen
Hidrolaze acide	N-acetil-glucosaminidază Catepsina G Catepsina D $\beta$ -glicuronidaza $\beta$ -glicerofosfatază $\alpha$ -manozidază		N-acetil-glucosaminidază Catepsina B Catepsina D $\beta$ -glicuronidază $\beta$ -glicerofosfatază $\alpha$ -manozidază
Alți constituenți	Defensine Azurocidine BPT (factor de creștere a permeabilității bacteriilor)	Citocrom b 558 Lactoferină Proteine care leagă vitamina B <sub>12</sub> Receptori chemo-atracțanți Receptori pentru adeziune	

\* Populații eterogene de organite (particule C și vezicule secretorii) care ar fi purtători de gelatinază

În linii mari există două mecanisme microbicide distincte: a) dependent de metabolismul oxidativ și b) independent de acest metabolism. Aceste mecanisme, cu unele deosebiri, sunt caracteristice tuturor celulelor cu funcții fagocitare (eozinofile, macrofage etc.) capabile de ardere respiratorie și, după caz, de degranulări.

Metabolismul oxidativ-dependent necesită activarea NADPH-oxidazei, care implică un complex format din mai multe componente localizate în membrana PMN și în special din flavoproteină și un citocrom unic de joasă potențialitate. Deci, activarea necesită prezența unei fracțiuni membranare asociată la o fracțiune citosolică, a acidului arahidonic și ionilor  $Mg^{2+}$ .

La microscopul electronic se poate urmări procesul fagocitării și se poate demonstra, prin colorarea peroxidazei, descărcarea granulelor azurofile, enzimele fiind eliberate rapid și masiv, procesul începând încă înainte de înconjurarea completă a materialului fagocitabil de către pseudopodele membranare, deci



încă înainte de formarea fagozomului. De fapt sunt eliberate două clase de produse: unele preformate încă în cursul maturării celulei și care sunt depozitate în organite și altele sintetizate ca urmare a stimulării celulei de către materialul fagocitat (tabelul 19).

Tabelul 19

Produse eliberate de către neutrofilele PMN umane stimulate consecutiv fagocitozei  
(după M. Bagglioni și col. și R. Lehrer și col.)

Produse preformate	Sintetizate extemporaneu
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gelatinaze și alte enzime stocate în organitele secretorii mici</li> <li>- Proteinele de legare a vitaminei B<sub>12</sub>, collagenaze, lactoferina și lizozimul stocat în granulele secundare</li> <li>- Hidrolazele acide, mieloperoxidaza, serin-proteinazele neutre, lizozimul etc.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Superoxidul, hidrogen-peroxidul, și alți metaboliți ai oxigenului formați via NADPH-oxidază</li> <li>- Producții de oxigenare ai acidului arahidonic: TxA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub></li> <li>- PAF format prin activarea unei acetil-transferaze</li> </ul>

Speciile preformate sunt în special enzime și alte macromolecule, iar cele nou-formate sunt molecule mici, derivate din metabolismul oxigenului și producții acidului arahidonic formați pe cale ciclo-oxigenazică (tromboxan, prostaglandine), sau lipooxigenazică (leucotriene). Formarea acestora din urmă este inițiată de către activarea dependentă de stimul a enzimei NADPH-oxidazei care va genera superoxizi, o fosfolipază (PLA<sub>2</sub>) ce va elibera acid arahidonic din fosfolipidele membranei și o transferază care va acetila precursorii PAF (factorului de aglutinare a trombocitelor).

Prin activarea sistemului oxidativ, oxigenazele reduc un electron de la nivelul oxigenului, proces care duce la formarea anionului superoxid ( $O_2^-$ ) care este în continuare redus de către enzima superoxid-dismutază (SOD) în peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ ), un puternic oxidant care poate distruge bacteria în prezența sau absența unor enzime lizozomale (mieloperoxidaze).

În afară de  $O_2^-$  și  $H_2O_2$ , în neutrofilele stimulate sunt și alte specii de oxigen redus cum ar fi  $^1O_2$  (singlet oxigen),  $OH^-$  (ionul hidroxil) sau hidroxi- și peroxi-radicali ( $HO^\bullet$  și  $ROO^\bullet$ ) care, dacă sunt eliberați în exces, pot provoca injurii vasculare și alte procese autoagresive.

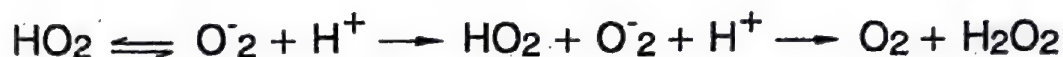
Anionul superoxid ( $O_2^-$ ) este inițial redus la expresia sa electronică cu rol oxidant și reductor. Nu se știe dacă funcția sa citotoxică este exercitată direct de către el sau de către produsele pe care le formează, respectiv prin  $OH^-$  și posibil prin  $^1O_2$ . Superoxidul generat este convertit în derivații toxici  $OH^-$  și  $H_2O_2$  care acționează singuri sau în combinație cu alți constituenți ai granulocitelor, cum ar fi mieloperoxidaza (MPO) sau lactoferina. Combinația MPO cu  $H_2O$  și  $Cl^-$  generează HOCl (acidul hipocloros) toxic. Este puseul respirator major, foarte eficace în distrugerea virusurilor, bacteriilor și fungilor.

Singlet oxigenul ( $^1O_2$ ). Oxigenul molecular conține două valențe sau, altfel spus, este bivalent. Când o absorbție de energie smulge un electron de pe orbită,

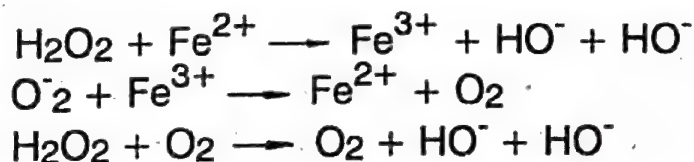
rezultă  $^1\text{O}_2$ , o stare excitată a  $\text{O}_2$ . Sunt două forme de  $^1\text{O}_2$ , *delta* și *sigma*, care-i exprimă energia prin emitere de lumină și care ar reacționa cu celulele sau cu produsele acestora, formând produse de excitație.

*Peroxidul de hidrogen* ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se poate forma fie direct din atomul de oxigen prin reducere bivalentă, fie prin formarea, într-o etapă intermediară, a  $\text{O}_2^-$ . De exemplu, glucozidaza pare să formeze  $\text{H}_2\text{O}_2$  direct din  $\text{O}_2$ , pe când *xantinoxidaza* formează  $\text{H}_2\text{O}_2$ , cel puțin în parte, din  $\text{O}_2^-$ .

În leucocite,  $\text{H}_2\text{O}_2$  s-ar forma prin dismutarea  $\text{O}_2^-$  în mod spontan sau prin catalizarea de către enzima SOD la pH 4,8 conform reacției:



Dismutarea spontană se pare că se face foarte rapid, deoarece pH-ul în vacuola fagocitară și probabil și în punctul de contact dintre țintă și leucocitul aderent este acid. În concentrații mari,  $\text{H}_2\text{O}_2$  este toxic pentru neutrofile și țesuturi, toxicitatea lui fiind amplificată de către unii agenți cu greutate moleculară mică, de genul acidului ascorbic. Anularea toxicității se face prin metabolizarea și transformarea sa în  $\text{H}_2\text{O}$  și  $\text{O}$ , via catalază și glutatión.  $\text{H}_2\text{O}_2$  interacționează cu  $\text{O}_2^-$ , dar această interacție este prea lentă pentru a avea vreo semnificație biologică. De aceea, în proces intervin unele metale, ca de pildă  $\text{Fe}^{2+}$ , care poate fi oxidat de către  $\text{H}_2\text{O}_2$  și redus de către  $\text{O}_2^-$  în maniera următoare:



În afară de  $\text{Fe}^{2+}$ , mai intervin și alți ioni cum ar fi cei de  $\text{Cl}^+$ ,  $\text{Br}^+$ ,  $\text{I}^+$  etc. De exemplu, peroxidaza se combină cu substratul ei ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) formând un complex enzimă + substrat, care conduce la formarea unor agenți cu proprietăți toxice potente. Primul oxidant ar fi acidul hipocloros ( $\text{HOCl}$ ) care, interacționând cu  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ar forma singlet oxigenul:



Oxidantii formați din ioduri pot include molecule de iod ( $\text{I}_2$ ), iod ( $\text{I}^+$ ), și acid hipoiodos ( $\text{HOI}$ ).

Condițiile de anaerobioză reduc, dar nu abolesc, efectul bactericid al neutrofilelor deoarece acestea, pe lângă sisteme litice oxigen-dependente, au și sisteme oxigen independente (tabelul 20).



Sisteme antimicrobiene ale granulocitului neutrofil

În relație cu oxigenul	În relație cu enzime (peroxidaze)	Agentul litic
Dependente de oxigen	Mediat de mieloperoxidaze	$H_2O_2$
	Independent de mieloperoxidaze	$H_2O_2$ ; $O_2^-$ ; $HO^*$ ; $^1O_2$
Independente de oxigen		Acid hidrolazic Proteinaze neutre Proteine cation Colagenaze Lizozim, lactoferină, gelatinaze, catepsină, glicerofosfataze

\* În cadrul acestor proteine sunt:

- BPI (proteina care induce creșterea permeabilității bactericidale). Membrana externă a bacteriilor devine permeabilă pentru moleculele hidrofobe datorită lezării ei;
- Proteine antimicrobiene azurofile derivate (lipsește la bolnavii cu boala Chediak-Higashi care suferă de infecții cronice cu *S. aureus*);
- Catepsina G cu activități esterazice de genul chemotripsinei, inhibitoare a sintezei macromoleculelor și a consumului de oxigen. Este activată de bacteriile Gram+;
- Defensinele eliberate ca răspuns la stimulii macromoleculari și celulari cu efect citotoxic pentru multe celule normale sau transformate neoplazice.

De altfel, chiar și bacteriile au susceptibilități diferite la mecanismele litice ale acestor celule. De exemplu, cele care produc catalază și pot degrada  $H_2O_2$  sunt mai rezistente la sistemul  $H_2O_2$  mediat de peroxidază decât cele care nu produc catalază.

Dar, în linii mari, radicalii de oxigen catalizează peroxidarea lipidelor, lezionarea ADN, degradarea și distrugerea proteinelor, toate acestea ducând la moartea bacteriei. Conținutul granulelor PMN rămâne probabil inert atât timp cât membrana plasmatică a celulei este intactă. Dar, imediat ce aceasta este stimulată de prezența unor particule străine, are loc "degranularea" prin fuziunea granulelor fie cu membrana perivacuolară a fagozomului, fie cu cea plasmatică a celulei și vărsarea conținutului lor în vacuole sau extracelular. Se pare că degranularea granulelor azurofile și a celor secundare se face independent, factorii opsonici influențând granulele care urmează să fuzioneze cu fagozomii. De exemplu, fagozomii care conțin bacteriile *S. typhimurium*, opsonizate prin fracțiunea C3a a complementului, produc defensine dar nu și lactoferină sau proteine care leagă vitamina B<sub>12</sub>. Acestea vor fi prezente în fagolizozom numai dacă opsonizarea s-a făcut prin receptorii Fc ai IgG.

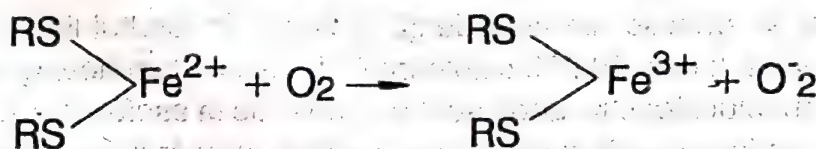
Vacuolele fagocitare nu au un pH prea acid: în primele 15-45 de minute după formare sunt neutre, pentru ca ulterior să se înregistreze o ușoară acidifiere, pH-ul scăzând la 6. Acidifierea prematură este în detrimentul activității antimicrobiene, fiind frecventă la persoanele cu boala granulomatoasă cronică. Granulocitele PMN acționează ca elemente active și bine integrate în sistemul de apărare imun, fiind în interdependență cu alte populații moleculare, dar și sub controlul acestora. În cazul unor deficite ale funcțiilor de control, cum se observă uneori în clinică, se ajunge la hiperoxie cu producerea de leziuni grave ale pulmonului, cordului, creierului etc. Hiperoxia se produce atunci când rata crescută a producției



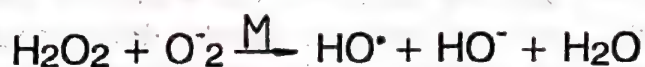
speciilor de oxigen depășește mecanismele de epurare a lor. Se ajunge la creșterea permeabilității pentru ioni a țesuturilor endoteliale și epiteliale ale pulmonului, cu apariția edemului interstițial și alveolar, la hemoragii pulmonare sau, în cazul neuronilor, la convulsii cerebrale. Primul eveniment care generează leziunile este producerea în exces a oxigenului și scăderea eficienței mecanismelor anti-oxidante ale organismului. Rata crescută a producției de specii toxice de oxigen se poate instala și în unele stări patologice cum ar fi în ischemie (în special după infarct miocardic), în boala canceroasă, după iradierii cu raze X sau după administrarea unor substanțe anticancerogene. În astfel de situații, în primul moment se produce în exces  $O_2^-$  (anionul superoxid) care este rapid dismutat în  $H_2O_2$  (peroxid de hidrogen). Dacă aceste specii de oxigen, care nu sunt foarte toxice, sunt influențate de ioni metalici și în special de  $Fe^{2+}$ , atunci se formează  $OH^\bullet$  (radicalul hidroxil) sau specii foarte reactive de complexe oxigen + fier.



sau



Se pare că cea mai mare reactivitate o are  $OH^\bullet$  format sub acțiunea ionilor metalici (M).



Epuratorii eficienți ai  $HO^\bullet$  ar fi DMSO (dimetil sulfoxid), DMTU (dimetiltiurea), DFX (desferioxiamina) care este un chelator al  $Fe^{2+}$ , BHT (butiratul de hidroxitoluen) etc.

În organism există unele limfokine care influențează mobilitatea și funcțiile fagocitare sau citotoxice ale PMN și diverse enzime care inhibă producerea moleculelor toxice de oxigen. Este cazul glutation-peroxidazelor, SBTI (soybean trypsin inhibitor), TPCK (L-1-tosilamid, 2-fenil-etil-clorometil-cetona),  $\alpha 1$ -antitripsinei etc. Toate acestea modulează funcțiile granulocitelor PMN, menținându-le în limite fiziologice normale.

Deși lipsite de specificitate funcțională, aceste celule pot influența răspunsul imun specific prin eliminarea antigenului și, deci, anularea stimulului, prin blocarea complexelor antigen-anticorp etc. La om, neutrofilele din circulație sunt eterogene, exprimarea receptorilor Fc pe suprafața lor fiind diferită. Din acest punct de vedere ar exista cel puțin două subpopulații cu proprietăți funcționale distincte: unele formează rozete cu hematii care au legat specific pe suprafața lor anticorpi IgG, aderă mai bine la suprafețe solide, fagocitează și omoară mai intens bacteriile opsonizate (pe care s-au fixat specific anticorpii) și sunt atrase chemotactic mai intens de componentele C5a ale complementului. Ele participă la formarea abceselor sau la reacțiile inflamatorii sterile, fiind primele care migrează în circulație; altele nu au aceste caractere, fiind o subpopulație care exprimă receptorul Fc mai slab și care s-ar putea să fie formată din celule mai tinere.



Sunt celule care participă la o varietate de procese patologice, inclusiv la reacțiile alergice antiparazitare. Au fost descoperite de către EHRLICH în anul 1878, care le-a dat numele de mastocite, de la *mastung*, a îngrășa. Această denumire a fost sugerată de faptul că ele sunt prezente din abundență în zona de țesut conjunctiv, unde posibilitățile de nutriție locală par a fi mai abundente. Se găsesc în leziunile de urticarie cutanată, în inflamațiile cronice ale gingiilor, viscerelor etc. Hiperplazia lor este întâlnită în leziuni cu proliferare fibroasă, ca de pildă în filarioză, schistosomiază, sifilis, tuberculoză, miocardite reumatoide, artrite etc. Ulterior s-a demonstrat existența lor și la nivelul țesuturilor normale și chiar în circulația sangvină. Tapițează traiectele căilor respiratorii și digestive și se găsesc din abundență în piele, mai ales la nivel postcapilar, adică acolo unde au loc permeabilizarea vasculară, extravazarea macromoleculelor și diapedeza leucocitelor.

În felul acesta mastocitele protejează organismul de agresiunea unor substanțe nocive, fiind la rândul lor stimulate de către acestea.

De asemenea, se găsesc din abundență în timus, în țesutul limfoid, vezica urinară etc. În piele ar fi cca. 10 000 celule/mm<sup>3</sup> de țesut. Cam același număr ar fi și la nivelul tractusului digestiv, unde sunt prezente de la esofag până la colon, dar în special în lamina proprie a intestinului subțire. Numărul lor crește mult în boala Crohn sau în infecții intestinale, în special în cele cu nematode. Se pare că, la acest nivel, mastocitele și filetele nervoase vegetative sunt intim asociate funcțional, motiv pentru care ele sunt implicate în diverse activități dintre care unele sunt relevante pentru funcțiile intestinului. Este cazul contractibilității mușchiului neted, stimulării acidului gastric, secreției de alcaline de către ileon, modificării fluxului ionic prin celulele epitelului intestinal etc.

Precursorii lor derivă din măduva osoasă, migrând în torentul circulator și apoi în țesuturi, unde se diferențiază în subpopulații eterogene, care din punct de vedere histologic ar aparține la două grupe majore denumite la rozătoare *mastocite ale țesutului conjunctiv* și *mastocite ale mucoaselor*, iar la om, *mastocite triptozo-pozitive* și *chimazo-negative* și *mastocite triptozo-pozitive* și *chimazo-pozitive*, notate Mc<sup>-</sup> respectiv Mc<sup>+</sup>. Mastocitele țesutului conjunctiv pot fi deosebite de cele ale mucoaselor nu numai prin localizarea lor, dar și prin caracterele lor morfologice sau afinitatea tinctorială. Cele de tip "conjunctiv" sunt predominant prezente în piele, în mușchii gastrici, conțin multe granule cu mari cantități de histamină și heparină, dar nu conțin aproape deloc leucotriene, fapt care sugerează rolul lor major în reacțiile de hipersensibilitate, dar minor în procesele inflamatorii. Cele de tip "mucoasă" conțin condroitin-sulfat E, cantități mici de histamină și cantități mari de leucotriene. Nu conțin deloc heparină.

Și la om cele două subpopulații diferă între ele prin conținutul de proteaze neutre (tabelul 21). Celulele Mc<sup>-</sup> sunt localizate predominant la nivelul mucoaselor nazale, intestinale, iar cele Mc<sup>+</sup> la nivelul submucoaselor. De altfel, la fiecare dintre aceste nivele există un amestec al acestor două subpopulații, criteriul de clasificare al lor nefiind prea exact (tabelul 22).

Tabelul 21

**Conținutul în proteaze neutre la mastocite și bazofile  
(după J. Miller și L. Schwartz)**

Proteaza	Caracterul fizico-chimic	Conținutul în pg/celule		
		Mc <sup>-</sup>	Mc <sup>+</sup>	Bazofile
Triptaza	Tetramer de 134 kD conținând Lys și Arg <sup>*</sup>	10	35	0,04
Chimaza	Monomer de 30 kD conținând Try și Phe <sup>*</sup>	0,04	4,5	0,04
Carboxipeptidaza	Monomer de 34 kD conținând Leu și Ala <sup>*</sup>	-	10 - 25	-

\* Aminoacizii care conferă specificitate funcțională și antigenică moleculei.

**Notă.** Pentru identificarea celor două subpopulații umane de mastocite, se folosesc tehnici histochemice. Se realizează o dublă marcarea a secțiunilor de țesuturi, fixate cu Carnoy, cu un ser polivalent antichimază obținut pe iepure și un ser monovalent antitriptază obținut pe șoarece. Celulele Mc<sup>-</sup> care conțin numai triptază se colorează în albastru iar cele Mc<sup>+</sup> care conțin triptază și chimază se colorează în brun.

Originea subpopulațiilor mature de mastocite nu este pe deplin cunoscută, în sensul că nu se știe precis dacă derivă dintr-un precursor hematopoietic unic sau din diverși precursori.

În cazul mastocitelor peritoneale de șoarece, se pare că există precursori diferiți care, sub influența IL-3, generează celule de tip "mucoasă" cu o densitate celulară joasă, sau care, sub influența mediului de cultură îmbogățit în interleukină-3 și 4 (IL-3; IL-4), generează celule cu densitate mare, de tip "țesut conjunctiv".

Tabelul 22

**Distribuirea mastocitelor Mc<sup>-</sup> și Mc<sup>+</sup> în țesuturile normale umane  
(după J. Miller și K. Schwartz)**

Țesutul sau organul	Pozitia	Procentul mastocitelor /	
		Mc <sup>-</sup>	Mc <sup>+</sup>
Piele	Derm	12	18
Pulmon	Subepiteliul bronșic	77	23
	Epiteliul bronșic	95	5
	Peretele alveolar	93	7
Intestin subțire	Mucoasă	98	2
	Submucoasă	13	87
Perete vascular		5	95



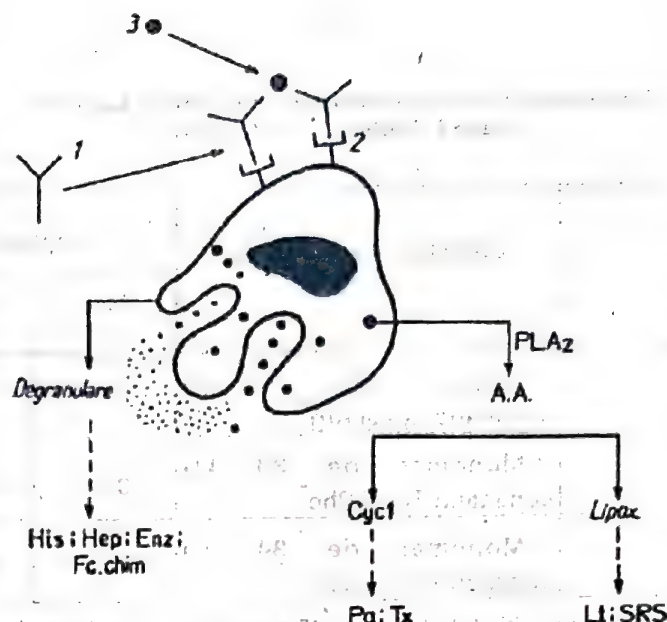


Fig.39. Eliberarea de mediatori chimici cu rol în declanșarea unor procese inflamatorii de către mastocite. Moleculele de IgE (1) se fixează la receptorul lor (2) de pe membrana mastocitelor. Alergenul (3) este recunoscut specific, legând încrucișat moleculele de IgE, proces în urma căruia sunt activate degranularea mastocitelor și eliberarea de histamină (His), heparină (Hep), enzime (Enz) și diverși alți factori chimici (Fc.chim). Totodată este activată fosfolipaza A2 (PLA2) care va stimula metabolismul acidului arahidonic (AA) și producerea de prostaglandine (PG) sau tromboxani (Tx) pe cale ciclooxygenazică (Cycl), sau de leucotriene (LT) sau "substanțe de reacție lentă" (SRS) pe cale lipooxygenazică (Lipox).

Capacitatea de proliferare și sinteză de mediatori solubili a acestor celule depinde în mare măsură nu numai de precursorii lor; ea este mult influențată și de unii factori din mediul înconjurător unde are loc maturarea, factori ce ar genera semnale capabile să influențeze potențialul de sinteză al celulelor, orientându-le spre o direcție sau alta. La om, de exemplu, se pare că ar fi totuși linii distincte  $Mc^-$  și  $Mc^+$ , proliferarea celor  $Mc^+$  având loc înaintea celor  $Mc^-$ .

La pacienții cu SIDA există o scădere selectivă a populației  $Mc^-$  de la nivelul mucoasei și submucoasei intestinului, fără o modificare semnificativă a populației  $Mc^+$ .

Celulele mature sunt mononucleare, ovoidale sau alungite, cu granule cu diametrul de 0,2-0,4  $\mu m$ , care maschează nucleul, cu un reticul endoplasmatic rugos, cu numeroase mitocondrii, filamente submembranare și granule metacromatice dense. Granulele sunt dispuse sub formă de "sul", de "fișic" sau, în unele stări de activare a celulelor, sub formă de "grilaj". Morfologia lor ar corela cu compoziția în proteaze neutre; la unele  $Mc^+$  ambele proteaze sunt în aceeași granulă iar granulele sunt mai mari, cu forme mai puțin variabile și cu o dispunere sub formă de "grilaj". Pe baza caracteristicilor ultrastructurale se pot deosebi celulele  $Mc^-$  de cele  $Mc^+$ , fapt care demonstrează că exprimarea acestor caracteristici nu este influențată de factorii locali ci este în mare măsură rezultatul provenirii lor din precursori diferiți. Fiecare celulă are cca. 100 000 - 500 000 de receptori de membrană pentru moleculele IgE, pentru IgG, unele componente ale complementului ca de pildă C3a, C5a etc. Mastocitele de șoarece au și receptori pentru subclasele IgG1, IgG2a, IgG2b iar cele de șobolan, receptori pentru componenta C3b a complementului.

Receptorii pentru IgE sunt de natură glicoproteică, cu greutatea moleculară de 55-60 kD. Prin intermediul lor, celulele pot fi stimulate și activate de către IgE, fragmentele C3a și C5a ale complementului etc.

Deși sunt capabile de mișcări ameboidale și de fagocitoză, atributul lor funcțional major este acela de eliberare de mediatori chimici, cu rol în declanșarea unor procese inflamatorii, sau a unor reacții de hipersensibilitate (fig. 39). Grație acestor proprietăți funcționale, ele sunt primele celule care stimulează afluxul granulocitelor PMN și al monocitelor la locul inflamației. Stimulate prin ionoforul A 23187 sau IgE, mastocitele eliberează activ o serie de mediatori solubili preformați sau formați ca urmare a stimulului survenit (tabelul 23).

Unele peptide, ca de pildă peptida intestinală vasoactivă (VIP), bradichinina, neurotensina sau somatostatina, provoacă eliberarea de histamină de către mastocitele conjunctive, pe când altele, cum ar fi substanța P, activează funcțiile secretorii atât ale mastocitelor conjunctive, cât și ale celor de "tip mucos". Componentele majore proteice ale granulelor secretorii ale mastocitelor sunt proteazele neutre dintre care două, după cum am mai menționat, permit identificarea a două tipuri diferite de mastocite umane. Este cazul *triptazei* și *chemazei*.

Și alte proteaze pot servi ca markeri pentru mastocite. Este cazul carboxipeptidazei, elastazei, catepsinei G etc.

O componentă majoră a granulelor secretorii ale acestor celule o reprezintă peptidoglicanii, niște lanțuri laterale de glicozamine, glicani cu sarcină electrică negativă, legați la o proteină monomer CORE, responsabili de colorația metacromatică a moleculelor. Producții de metabolism ai acidului arahidonic sunt vasoactivi și spasmogeni, cu activitate chemotactică. Provin atât din "linia" lipoxygenazică, având ca reprezentanți majori leucotrienele, cât și din cea ciclo-oxygenazică, de genul prostaglandinelor (PG) și tromboxanilor (Tx).

Tabelul 23

Formarea mediatorilor mastocitelor în raport cu momentul stimulului celulei

Momentul formării	Mediatorii
Preformați (prezenți în granulele secretorii înainte de stimul)	Histamina (1 - 2 pg/celulă) Superoxiddismutaza (SOD) Factorii chemotactici neutrofilii (NCF) Proteoglicanii Factorii chemotactici eozinofilii ai anafilaxiei (ECF - A) Enzime lizozomale Peroxidaze Heparina Chemotripsina Serotonina
Nou formați (consecutiv activării mastocitelor)	Prostaglandina (PGD <sub>2</sub> ) Tromboxan (Tx) Leucotriene (LT) Factorul de activare a trombocitelor (PAF)

De asemenea un produs major de secreție este histamina, prezentă atât în granulele mastocitelor cât și în cele ale bazofilelor. Unii dintre mediatorii mastocitelor sunt preformați, în timp ce alții sunt sintetizați ca urmare a stimulului declanșator.





Interacția antigenului cu anticorpul din clasa IgE fixați specific sau citofilic la celulă, respectiv prin *Fab* sau *Fc*, inițiază degranularea acestora, un proces biologic rapid, dependent de temperatură și de prezența  $Ca^{2+}$ . Reacția este însoțită de scăderea cAMP de la nivel celular. După fixarea antigenului la IgE, se transmite un mesaj intracitoplasmatic care inhibă activitatea adenilciclazei, o enzimă care transformă adenzintrifosfatul (ATP) în 3'-5'-adenozinmonofosfat ciclic. Scăderea cAMP este contrabalansată de activarea guanilciclazei și creșterea pragului de guanidin-monofosfat ciclic (cGMP) asociată cu transportul granulelor către peretele celular și eliberarea extracelulară a diverșilor mediatori cantonați în acestea.

Practic, "degranularea anafilactică" s-ar realiza în secvențe multiple care ar dura între 1 minut și 48 de ore. Inițial, granulele mastocitelor se "umflă" și încep să comunice între ele prin fuziunea membranelor. Se formează "canale de degranulare" care conțin matricea granulară modificată și care se deschid prin "pori" în membrana plasmatică. Prin aceste canale este eliberat conținutul proteic și lipidic al granulelor, tot procesul durând cca. 20 de minute, timp în care are loc și eliberarea histaminei la intensitate maximă. Multe canale de degranulare, prin exteriorizarea lor, provoacă o alungire a suprafeței celulare care, la examenul microscopic, apare sub formă de pliuri. Alte canale, care nu s-au alungit și nu au format pliuri, nu au deschidere la membrana celulară. Ulterior, sunt activate mecanismele de sinteză celulară, cu referire specială la aparatul Golgi și ribozomi, timp în care se înregistrează mărirea volumului nucleului și formarea de noi granule.

Toate aceste procese sunt însoțite de creșterea volumului celulei și de modificări în morfologia ei.

În afară de IgE, principalul anticorp sensibilizant, mastocitele mai pot fi degranulate de către IgG4 sau chiar de către dextran, concanavalină A (Con A), hormonj adrenocorticoizi (ACTH), vitamina A, diverși polimeri etc. Timpul de activare necesar pentru declanșarea degranulării este condiționat de natura stimulului primit de către celulă. Activarea prin antigen declanșează un răspuns rapid, pe când semnalele primite de la anafilatoxine sau de la factori secretați de către limfocitele T necesită un timp mai lung până la eliberarea mediatorilor preformați sau nou sintetizați.

În afară de procesele inflamatorii și alergice, se pare că aceste celule intervin și în apărarea antitumorală, fiind capabile să ucidă unele celule tumorale, probabil prin sinteza și eliberarea masivă de serotonină. Bazofilele și mastocitele sunt similare din multe puncte de vedere, ambele posedând granule metacromatice și receptori de mare afinitate pentru IgE. Se credea, până nu de mult, că o deosebire esențială între mastocite și bazofile este aceea că primele nu se găsesc în circulație ci numai în țesuturi. Ulterior, s-a dovedit că și mastocitele sunt celule circulante, care nu conțin "proteina de bază majoră" (MBP) sau lizofosfolipaza, deosebindu-se din acest punct de vedere de bazofile.

Multe dintre substanțele eliberate de mastocite pot afecta țesutul conjunctiv ducând la fibroză și alterări tisulare profunde. De exemplu, histamina stimulează proliferarea fibroblastelor și sinteza colagenului, heparina exercită o importantă activitate chemotactică pentru celulele de la nivelul endoteliului capilar, proteoglicanii au rol în vindecarea rănilor cutanate etc.

## CELULELE PREZENTATOARE DE ANTIGEN (APC) DIN SERIA MIELOIDĂ

Sunt "celule accesorii" ale răspunsului imun, tipul reprezentativ cel mai bine cunoscut fiind cele din seria monocitar-macrofagică, înzestrate cu funcții fagocitare (tabelul 24).

Tabelul 24

Unele caracteristici ale celulelor prezentatoare de antigen  
derivate din seria mieloidă

Caracteristici	Celulele		
	Dendritice	Langerhans	Monocite/macrofage
Organul	Ganglioni Timus Țesuturi Sânge (?)	Epiderm	Sânge (monocite) Suprafața mucoaselor Țesuturi
Aderența la suprafețe	+	+	+
Capacitatea de a reține și prezenta antigenul	+	+	+
Funcții fagocitare	-	-	+
Granule Birbeck	-	+	-
Receptori $F_c$ ( $FcR$ )	-	+	+
Receptori pentru complement	-	+	+

De fapt, celulele care prezintă antigenul limfocitelor *T* aparțin la diferite populații, dintre care cele mai active sunt celulele dendritice, macrofagele și limfocitele *B*. Macrofagele fagocitează antigenul și îl prelucrează înainte de a-l prezenta limfocitelor, pe când celulele dendritice și limfocitele *B* nu-l internalizează sau nu-l prelucrează, fixând, prin intermediul receptorilor de membrană, macromoleculele solubile, străine de organism, care vor fi apoi recunoscute de către limfocitele *T*. Toate aceste celule alcătuiesc, sub raport funcțional, grupa celulelor "prezentatoare de antigen", sau APC ("antigen presenting cells").

### CELULELE DENDRITICE

Existența lor a fost descoperită în anul 1973 când au fost considerate ca "un nou tip de celule în organele limfoide periferice ale șoarecelui". Ulterior, s-a stabilit că sunt prezente și în afara organelor limfoide, fiind larg răspândite în tot organismul și înzestrate cu un important rol potențial în inducerea răspunsului imun. În țesuturi se găsesc în proporție mai mică de 1% din totalul leucocitelor, se deosebesc morfologic și antigenic de monocite și limfocite, caracteristica lor funcțională majoră fiind capacitatea de stimulare a limfocitelor *T*, cu rol reglator în



reacțiile mixte leucocitare. Izolarea din organele limfoide și din sânge se bazează pe o proprietate particulară a acestor celule: aderă la suprafețe imediat după izolare, pentru ca să devină neaderente după 24 de ore de cultivare *in vitro* (probabil ca urmare a modificării numărului sau structurii moleculelor de adeziune de la nivelul membranei plasmatică).

În general, izolarea este dificilă, suspensiile celulare conținând și macrofage, motiv pentru care se recurge la numeroase metode și tehnici care țin cont de proprietățile și caracteristicile acestor celule: a) centrifugare în gradient de serumalbumină bovină; b) aderență selectivă la suprafețe; c) iradierea suspensiilor pentru uciderea celulelor sensibile (celulele dendritice sunt radiorezistente); d) citotoxicitate complement-dependentă cu utilizare de anticorpi monoclonali care recunosc determinanții antigenici specifici macrofagelor, celulelor NK etc.

Au o formă neregulată, cu proeminențe ascuțite ca niște spini sau sub formă "bulbară", de lamele etc., din cauza formei lor particulare fiind denumite "celule interdigitale". Nucleul este oval sau de formă neregulată, citoplasma conține numeroase mitocondrii dense, care se deosebesc de cele filamentoase ale macrofagelor. Au puțini poliribozomi, sunt sărace în reticul endoplasmatic rugos dar bogate în reticul neted.

Nu fagocitează și au activitate slabă pinocitară, adică nu internalizează particulele solide și introduc puține molecule solubile intracelular, motiv pentru care sunt sărace în vezicule endocitare și lizozomi. Se pare totuși că *in vivo*, celulele interdigitale au funcții fagocitare. Se găsesc în ariile T-dependente ale organelor limfoide și în alte organe, ca de pildă rinichi, ficat, inimă, pancreas, tiroidă, unde au forme diferite și exprimă funcții diferite (tabelul 25).

Celulele Langerhans din piele, care derivă probabil din monocite deoarece exprimă receptori pentru complement și Fc, pot să se diferențieze *in vitro* în celule dendritice, de unde speculația teoretică a originii acestora din seria mieloidă. Citoplasma este bogată în granule Birbeck. Totuși, nu au markerii antigenici specifici monocitelor-macrofagelor, deși exprimă pe suprafața membranei antigene MHC de clasa I și în special de clasa II și HLA-DP și HLA-DQ. Mai mult, celulele Langerhans pot prelucra și prezenta antigenul limfocitelor T, inițiind răspuns imun specific cu rol major în protecția față de unele parazitoze cutanate, ca de pildă leishmanioza, pe când celulele dendritice ar prelucra eventual foarte slab antigenul, lipsa enzimelor lizozomale fiind suplinită de unele enzime peptidazice de la nivelul membranei (conțin fosfataze acide, peroxidaze, esteraze, ATP-aze legate la membrană). Se deosebesc de macrofage și prin capacitatea redusă sau chiar nulă de sinteză a unor citokine. Ar produce doar IL-1 și IL-6, deși această funcție încă nu este bine precizată deoarece sunt lipsite de mRNA. Caracteristica majoră a acestor celule este potențialul lor de atașare la limfocitele T.

Exprimarea masivă a antigenelor MHC de clasa I și II, sărace în acid sialic, și a moleculelor de adeziune ar asigura un mare potențial de reținere a limfocitelor T și de prezentare a antigenului în asociere cu moleculele MHC, într-o manieră amplificată.

Dificultățile în separarea și obținerea unei populații purificate de celule dendritice sunt cauza multor lacune în cunoașterea aprofundată a biologiei lor, dar este cert că ele au rol important în prezentarea antigenului și în cooperările celulare necesare generării răspunsului imun specific.

**Tipuri de celule dendritice cu caracteristici, localizări și funcții diferite  
(după Ph. King și D. Katz)**

Tipul celulei	Localizare	Rolul funcțional major
Celula dendritică timică	Medulara timusului	Inducerea toleranței
Celula dendritică interditală	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Paracortexul ganglionilor limfatici</li> <li>- Foița limfatică periarteriolară splenică</li> <li>- Plăcile Peyer</li> <li>- Medulara timusului</li> </ul>	Prezentarea antigenelor limfocitelor T
Celula dendritică interstițială	- În parenchimul organelor (țesut conjunctiv interstițial) cu excepția creierului	- Captarea și prelucrarea antigenului
Celule dendritice foliculare	<ul style="list-style-type: none"> <li>- În centrul germinativ (ariile B dependente din splină și ganglioni)</li> <li>- În plăcile Peyer</li> </ul>	- Reglarea memoriei limfocitelor B
Celule Langerhans	- Epiderm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Captarea și prelucrarea antigenului</li> <li>- Rol important în protecția față de unele parazitoze cutanate (<i>Leishmania</i>)</li> </ul>
Celula cu "vâ"	<ul style="list-style-type: none"> <li>- În limfaticile aferente ale ganglionilor</li> <li>- În ductul limfatic toracic</li> </ul>	- Transferul de antigene
Celula dendritică din sângele periferic	Sânge periferic	- Forma migratoare a celulelor dendritice

#### FAGOCITELE MONONUCLEARE (MONOCITELE ȘI MACROFAGELE)

Sunt celule larg răspândite în organism, care formează "sistemul fagocitelor mononucleare" derivat din seria mieloidă.

Au fost descoperite de către METCHNICOV (1883), care le-a dat denumirea de macrofage datorită vitezei cu care pot fagocita particulele străine. Derivă din "promonociți", precursori medulari care pătrund în curentul sanguin în absența stimulilor inflamatori, transformându-se în "monocite" care rămân în circulație un număr limitat de ore (la șoarece cca. 22 de ore) după care ajung în țesuturi unde se diferențiază în macrofage rezidente cu morfologie caracteristică și chiar cu markeri antigenici caracteristici. Deci, monocitele nu constituie o subpopulație



distinctă de macrofage, ci forma lor circulatorie aflată într-un stadiu timpuriu de dezvoltare. În linii mari, evoluția lor este următoarea:

- a) la nivelul măduvei osoase sunt: celula matcă → hemocitoblast → monoblast → promonocit →
- b) în circulația sangvină → monocit →
- c) în țesuturi → celule mature, cu diferite denumiri.

Fig.40. Aspectul ariei de migrare a macrofagelor *in vitro*. Macrofagele incubate *in vitro*, într-un tub capilar plasat într-o placă Petri cu mediu de cultură pentru limfocite, părăsesc capilarul răspândindu-se în jurul orificiului de ieșire de la extremitatea acestuia. Suprafața pe care se răspândesc este vizibilă cu ochiul liber, având forma unei coroane de pom.



Pătrunderea macrofagelor în țesuturi este precis controlată de către receptori de adeziune, care interacționează cu liganzi caracteristici locului respectiv. Ele formează populația "fixă", capabilă totuși de mobilitate, care *in vitro* se poate vedea cu ochiul liber (fig. 40), populație care poartă denumiri diferite condiționate de locul în care se găsesc (tabelul 26).

Tabelul 26

Denumirea fagocitelor mononucleare în relație cu locul lor de cantonare în organism

Denumirea celulelor	Organul sau țesutul unde s-au fixat
Monocite	În sânge
Macrofage peritoneale	La nivelul peritoneului
Macrofage alveolare	La nivelul alveolelor pulmonare
Celule Kupffer	În ficat
Celule microgliale	În creier
Osteoclaste	În țesutul osos
Celule Langerhans *	În piele

\*A nu se confunda cu insulele Langerhans din pancreas.

Unele dintre ele sunt mai aderente la suprafața sinusurilor sau interstițiilor, cum ar fi microgliile din sistemul nervos, celulele Kupffer din ficat, celulele Langerhans din epiteliu, pe când altele sunt slab aderente. Este cazul celor peritoneale sau alveolare care au o morfologie diferită (rotunde) și care pot fi îndepărtate prin lavajul suprafeței cu lichide reci.

Macrofagele sunt extrem de eterogene din punct de vedere morfologic. De exemplu, monocitele, cele mai bine studiate datorită ușurinței cu care pot fi recoltate și separate de restul celulelor, au un diametru c e 10-18  $\mu\text{m}$ , deci sunt ceva mai mari decât limfocitele și au un nucleu caracteristic, în formă de potcoavă.

Celulele fixe pot varia ca dimensiuni de la 50 la 200  $\mu\text{m}$ . Ca și monocitele, ele au o citoplasmă relativ abundentă, bogată în lizozomi de forma unor granule mari, care conțin peroxizi și hidrolaze acide cu rol major în uciderea intracelulară a microorganismelor. Nucleul poate avea formă rotundă, ovală, reniformă sau de potcoavă, dispus central. În cazul fagocitării unor materiale voluminoase, el poate fi deplasat spre periferia celulei. Marginile celulei sunt "dantelate" cu microvili proeminenți, cu numeroase prelungiri, uneori extrem de fine și lungi, care tind să ajungă la particulele fagocitabile. *In vitro*, aderă la suprafețe de sticlă sau plastic, aspectul lor fiind condiționat de intensitatea aderării, de gradul lor de activare, de condițiile de cultivare etc. De exemplu, celulele care se găsesc într-o condiție fiziologică bună aderă la suport, devenind extrem de polimorfe; au aspect stelat, de fus, de suveică, sulică etc. (fig. 41).



Fig.41.. Aspectul macrofagelor cultivate *in vitro*. În condiții de cultivare optime, celulele aderă la suprafața vaselor de cultură, luând formele cele mai bizare: de fus, rachetă, suveică etc.

Când îmbătrânesc sau trăiesc în condiții improprii, celulele se rotunjesc, se desprind de suport, se vacuolizează și mor. Durata lor de viață este relativ scurtă (cca. 75 de zile), zilnic fiind înlocuite cca.  $7 \times 10^6$  celule/kg/oră.

Progenitoarele, derivate din seria mieloidă care formează sistemul fagocitar mononuclear, execută două funcții importante, efectuate de către două tipuri diferite de celule: unele sunt de profesie "fagocitare" cu rol în eliminarea particulelor de antigen, iar altele sunt "prezentatoare de antigen" limfocitelor cu receptori specifici, de unde și denumirea lor de "celule APC".

O delimitare categorică între aceste două populații funcționale este greu de făcut. În orice caz, celulele fagocitare pot fi activate de factori eliberați de limfocitele T și pot produce diferiți mediatori solubili, iar cele APC pot prezenta antigenul limfocitelor într-o manieră adecvată funcțional.

Prototipul APC este celula Langerhans din piele, cu o formă caracteristică de "rachetă de tenis" și granule Birbeck. Celulele Langerhans migrează în



paracortexul ganglionilor unde prezintă celulelor *T* antigenele aduse de la nivelul pielii. Sunt bogate în antigene de clasa II MHC.

În foliculii secundari ai arilor *B*-dependente din splină și ganglionii limfatici, se găsesc celulele dendritice cu rol de APC. Așa se explică de ce inocularea intradermică a unui antigen este urmată predominant de activarea limfocitelor *T* și răspuns imun imediat celular, iar inocularea i.v. sau s.c., de sinteză de anticorpi. Celulele APC au fost găsite și în medulara timusului. La acest nivel, ele sunt bogate în antigene MHC de clasa II, de unde concluzia că rolul lor ar fi acela de a informa precursorii *T* despre natura antigenelor, proprii organismului respectiv.

Tot macrofagele rezidente în țesuturile normale participă alături de granulocite la "prima linie de apărare" a organismului contra infecțiilor și diferitelor injurii, deplasându-se la locul afectat ca urmare a semnalelor chemotactice primite, dintre care majoritatea includ produse macrofage sau ale limfocitelor *T*. Cele nou sosite la locul agresiunii diferă funcțional de macrofagele rezidente. Ele sunt mai puțin mature, capabile de "oxidări respiratorii" și de eliberarea unui mare număr de produse secretorii implicate în amplificarea proceselor inflamatorii sau în alte procese biologice. Sunt fie macrofage "activate imunologic" consecutiv contactului cu germeni intracelulari ca de pildă BCG, fie "impulsionate" prin stimuli proveniți de la bacterii Gram-negative, cum ar fi LPS.

Din punct de vedere funcțional, celulele sistemului fagocitar au următoarele attribute majore: a) funcții fagocitare sau antixenice; b) activități de sinteză și secreție; c) activități citotoxice-citostatice și d) funcții reglatoare.

**Funcțiile antixenice ale macrofagelor** sunt cruciale pentru apărarea organismului împotriva unui mare număr de agresori. Ele exprimă un proces înalt selectiv, dar nespecific, care controlează interacțiunea dintre membrana celulară și suprafața particulei care urmează a fi înglobată, cele mai mici de  $0,1 \mu\text{m}$  fiind "pinocitate", iar cele mai mari, "fagocitate". Celula fagocitară poate face discriminarea între o particulă "ingerabilă" și una "neingerabilă", chiar dacă acestea sunt foarte aproape una de alta pe suprafața membranei. Aceste interacțiuni sunt necesare atât pentru inițierea fagocitozei, cât și pentru definitivarea ei, deci pentru emiterea de pseudopode și pentru programarea lor în vederea completei "învăluiri" a materialului ce urmează a fi înglobat.

Ulterior vor fi generate semnale care vor controla ingestia, digestia și asocierea componentelor imunogene ale antigenului cu componentele membranei celulei accesorii (fig. 42). Pe lângă acest mod de fagocitoză, există și o fagocitoză "imună" sau "opsonică", realizabilă atunci când antigenul este recunoscut și fixat de către

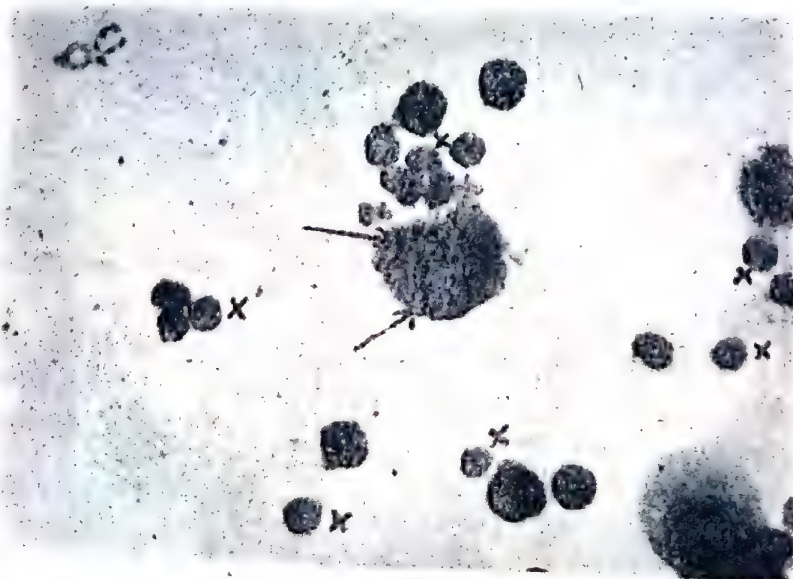


Fig.42. Monocit din sângele periferic uman, menținut *in vitro* în mediu de cultură în care au fost suspensionate hematii de oaie (X). După 30 de minute, se observă existența intracitoplasmatică a două hematii fagocitate (săgețile).



anticorpi, complex care poate sau nu poate fixa complementul. Molecula de anticorp se va fixa la receptorul pentru Fc de pe membrană prin fragmentul său Fc, sau complementul se va fixa la receptorul pentru complement și, prin intermediul acestora, antigenul va fi înglobat în celula fagocitară (fig. 43).

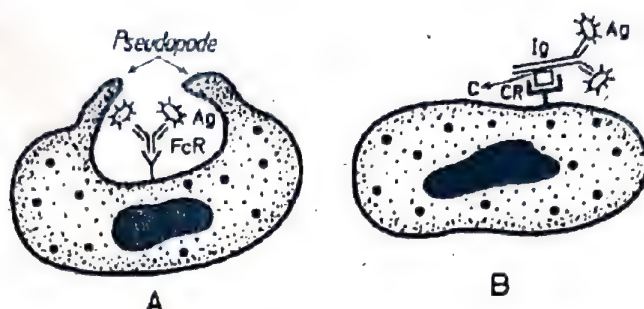


Fig.43. Fagocitoza "imună" sau "opsonică". A. Antigenul (Ag) este recunoscut specific de către moleculele de anticorp. Complexul antigen-anticorp format se fixează la receptorii de pe membrana macrofagelor (FcR), celulele emit pseudopode și înglobează intracitoplasmatic antigenul astfel fixat. B. Antigenul (Ag) este recunoscut de către anticorp (Ig) formând complexul antigen-anticorp care poate lega componente ale complementului (C). Receptorii pentru complement (CR) de pe membrana celulară fixează aceste componente reținând întregul complex.

În linii mari, secvențele procesului fagocitar sunt următoarele: atașarea antigenului la suprafața membranei celulare, urmată de generarea unor semnale care vor controla emiteria de pseudopode și formarea fagozomilor. Odată formați, fagozomii fuzionează cu lizozomii care furnizează enzimele necesare degradării materialului ingerat, degradare care are loc în fago-lizozom.

Spre deosebire de granulocitele PMN, macrofagul este mai sărac în enzime lizozomale, putând degrada antigenul parțial, cu menajarea epitopilor. După digestie, epitopii sunt proiectați pe suprafața membranei și prezentați limfocitelor care-i vor recunoaște specific. Experimental, este dovedit faptul că antigenul prelucrat de APC este mai imunogen în comparație cu cel neprelucrat. Mai mult, s-a constatat că antigenele slabe, după ce au fost fagocitate, devin antigene puternice dar, pentru aceasta, este necesar să fie prezentate limfocitelor numai de către macrofagele vii. Într-adevăr, dacă unor animale li se inoculează același antigen, fie singur, ca atare, fie după ce a fost fagocitat, răspunsul imun cel mai intens se înregistrează la animalele care au primit antigenul fagocitat, deci antigenul și macrofagele vii. Dacă macrofagele, care au fagocitat antigenul, înainte de inoculare sunt omorâte, răspunsul imun al animalelor astfel stimulate nu mai este la nivelul celui înregistrat cu macrofage vii. La imunizați, macrofagele primesc un semnal activator eliberat de către limfocitele T (MAF = macrofage activating factor, sau factorul de activare al macrofagelor) care le activează funcțiile. Aceste macrofage activate sunt mai mari în volum, au marginile mai sinuoase și mai dantelate, aderă mai puternic la suprafețe, au o activitate crescută a enzimelor lizozomale, un conținut mare de adenilciclază, o activitate bactericidă mare, activitate fagocitară intensă etc. Datorită exacerbarii funcțiilor lor, mai sunt denumite și *macrofage furioase*.

Activarea macrofagelor poate fi expresia unui proces nespecific generat de unul specific (influența exercitată asupra lor de către limfocitele T stimulate de antigen), sau tot nespecific, cum este cazul celor activate, nu de către MAF, ci de o varietate de substanțe de genul endotoxinelor bacteriene, ARN, diverși adjuvanți etc. Macrofagele activate eliberează masiv  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , au activitate bactericidă



sporită, produc factori solubili cu funcții citotoxice pentru o gamă largă de celule tumorale etc. Ele pot înconjura unele focare infecțioase și să formeze granuloame atunci când nu pot ucide bacteriile, izolându-le în felul acesta de restul țesuturilor organismului. În cazul în care la receptorii *Fc* de pe membrana lor se fixează molecule de anticorp, macrofagele devin *armate*, capabile deci să fixeze mult mai rapid și specific antigenele, fenomen de o importanță semnificativă în special în apărarea antitumorală. Exprimarea pe membrana macrofagelor a unor receptori, ca de pildă receptorul pentru componenta *C 3a* a complementului, receptorul *Fc* sau *MFR* (receptorul pentru manosyl-fucosyl), permite aderarea lor, fagocitarea și, implicit, activarea funcțională. De asemenea, unele citokine, ca de pildă cele secretate de către limfocitele *T* și în special *IFN - γ* reglează creșterea, diferențierea, mobilizarea și modularea unor funcții ale acestei populații de celule (tabelul 27).

Tabelul 27

Unele caracteristici și funcții ale macrofagelor rezidente în diferite țesuturi

Organul sau țesutul	Caracterul și funcțiile macrofagelor
Măduva osoasă și ficatul fetal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O rețea de macrofage mature, cu receptori de adeziune pentru celulele hematopoietice (mieloide, eritroide). Acestea se leagă la membrana macrofagelor, fără a fi fagocitate</li> <li>- Nu produc molecule active de oxigen</li> </ul>
Splină	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eterogene fenotipic</li> <li>- Situate în pulpa roșie și în zona marginală a pulpei albe</li> <li>- Funcții fagocitare</li> <li>- Interacționează cu limfocitele <i>T</i> și <i>B</i></li> </ul>
Ficat și intestin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Celulele Kupffer sunt relativ omogene, exprimă receptori <i>Fc</i> și <i>MFR</i> (receptori pentru manosyl-fucosyl). Interacționează cu hepatocitele</li> <li>- Sunt activate de BCG dar eliberează deficitar <math>O_2</math> sub influența <i>IFN - γ</i></li> <li>- Rezidente în lamina propria</li> </ul>
Pulmon	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O populație care tapisează suprafața alveolelor, dar care aderă slab la această suprafață. Implicate în apărarea locală</li> <li>- Sunt capabile de autoreplicare (proliferează <i>in vitro</i> ca răspuns la CSF)</li> <li>- Permeabilizează vascularizația, favorizând pătrunderea și recrutarea monocitelor</li> <li>- Contribuie la procesul de fibrozare în caz de silicoze</li> </ul>
Piele	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Celule Langerhans. Variaza în relație cu exprimarea markerilor caracteristici macrofagelor</li> </ul>
Sistemul nervos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Celule foarte arborizate (microglii) lipsite de multe dintre caracterele macrofagelor din alte țesuturi</li> <li>- Traversează bariera hematoencefalică în urma morții naturale a neuronilor</li> <li>- Microgliile din interiorul creierului exprimă puțin <i>CD 4</i>. Cele din afara barierei hematoencefalice exprimă intens acest marker</li> </ul>

Intensitatea și durata degradării antigenului ingerat este condiționată de către caracterele fizico-chimice ale acestuia. De exemplu, albumina serică este descompusă foarte rapid, pe când polizaharizii pneumococici sau polipeptidele sintetice sunt degradate lent. De asemenea, este cunoscut faptul că unele bacterii, cum ar fi mycobacteriile, pot persista foarte multă vreme în interiorul macrofagului fără a fi degradate.

**Funcțiile secretorii ale macrofagelor.** Este bine dovedit faptul că fagocitele mononucleare eliberează în mediul înconjurător substanțe cu greutate moleculară diferită, care joacă un rol important în mecanismele de apărare ale gazdei (tabelul 28). O parte dintre acestea au fost identificate ca entități chimice, în timp ce existența altora a fost intuită mai mult pe baza efectelor exercitate asupra altor celule sau bacterii. Unele dintre ele sunt într-adevăr secretate ca urmare a unei sinteze active, pe când altele sunt doar "desprinse" de la locul de sechestrare intracelulară în momentul în care celulele primesc anumiți stimuli din exterior. Intensitatea, natura și durata stimulilor externi influențează funcțiile secretorii ale acestor celule. În linii generale, macrofagele, fie că este vorba de forma lor circulantă (monocite), fie de cea a diferitelor tipuri de celule fixe, secretă enzime hidrolitice, unii derivați ai acidului arahidonic, diverse componente ale complementului sau alte produse cu efecte directe sau indirecte asupra unor funcții celulare (tabelul 29).

Tabelul 28

**Produse secretate de către macrofage după D. Rappolee și Z. Werb)**

*Hormoni polipeptidici*

Interleukina-1  $\alpha$  și Interleukina-1 $\beta$   
 Somatotropina  
 TNF- $\alpha$  (cașectina)  
 Interferon- $\alpha$   
 Interleukina-6  
 PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)  
 Substanța P  
 FGF (fibroblast Growth Factor)  
 FAF (fibroblast Activating Factor)  
 TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor)  
 TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ )  
 Thymosina B4  
 EPO (eritropoietina)  
 G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor)  
 GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Stimulating Factor)  
 EPA (Erythroid Colony -Potentiating factor)  
 FIM (Factor-Inducing Monocytopoiesis)  
 $\beta$ -endorphina  
 ACTH-(Adrenocorticotrophic Hormon)  
 PGF (Plasmacytoma Growth Factor)  
 Neutrophil-activating factor

*Componente ale complementului*

Calea clasică: C 1; C 2; C 3; C 4; C 5; C 6; C 7; C 8; C 9  
 Fragmente active ale complementului, generate de către proteinazele macrofagelor: C 3a; C 3b; C 5a; Bb  
 Calea alternativă: factorul B, factorul D, properdina



**Factori de coagulare**

Calea intrinsecă: IX; X; V; protrombină

Calea extrinsecă: VII

Activitate antitrombotică: inhibitori de plasmină; activatori ai plasminogenului

**Enzime proteolitice**

Metaloproteinaze: elastaze, collagenaze, gelatinaze, angiotensine, convertaze

Serin-proteinaze: urokinaza, activator de plasminogen

Aspartil-proteinaze: cathepsina D

Cistein-proteinaze: cathepsina B, cathepsina L

**Alte enzime**

- Lipaze: fosfolipaze, lipoproteinaze

- Glucozaminidaze: lizozim

- Hidrolaze acide lizozomale: proteaze, lipaza, fosfataze, sulfataze, glicozidaze

- Deaminaze: arginaze

**Inhibitori ai enzimelor**

- Inhibitori proteinazici:  $\alpha_2$ -macroglobulina, inhibitorul de plasmină

- Inhibitori fosfolipazici: lipomodulina

**Proteinele de adeziune celulară**

- Fibronectina, trombospondina, proteoglicani, condroitin-sulfati și heparin-sulfat

**Alte proteine de legare**

- Pentru metale: transferina

- Pentru vitamine: transcobalamina II

- Pentru lipide: apolipoproteina E

- Pentru factori de creștere: proteine de legare a TGF- $\beta$

- Pentru biotină: avidina

**Lipide bioactive**

- Produse ciclooxigenazice: PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>1</sub> $\alpha$ , PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , prostaciline, tromboxan

- Produse lipooxigenazice: leucotriene (LTB<sub>4</sub>, LTC, LTD etc.)

- PAF (platelet agglutinating factor)

**Alte substanțe**

- Oligopeptide: glutation

- Hormoni steroizi

- Purine și pirimidine: timidină, uracil, acid uric, cAMP

- Oxigeni intermediari: O<sub>2</sub><sup>-</sup>; OH<sup>-</sup>; O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- Nitrogeni intermediari: nitriți, nitrați

Unele sunt secretate consecutiv sintezei lor active induse de diverși stimuli, în timp ce altele, presintetizate, sunt doar eliberate. Astfel, hidrolazele acide, prezente în lizozomi, pot fi eliberate chiar și în absența oricărui stimul. În cazul stimulării cu unele complexe imune, ca pereți ai bacteriilor, particule minerale, componente ale complementului etc., se pot sintetiza activ astfel de enzime, care apoi sunt secretate. De asemenea, secreția lizozomului se poate face și în absența unor stimuli, dar ea este amplificată atunci când celulele sunt activate de stimulări exogene, nivelul seric al acestuia putând constitui un indicator al activității fagocitare a macrofagelor. În alte cazuri, eliberarea produselor precum și sinteza lor nu are loc decât ca urmare a stimulării celulare. De exemplu, "factorul de necroză al tumorilor" (TNF) este sintetizat și secretat numai atunci când șoarecii au fost stimulați cu BCG și după o lună de zile cu LPS.

Citokine care modulează fenotipul macrofagelor (după S. Gordon și col.)

Citokina	Sursa	Efectul asupra macrofagelor
Interleukin-1 (IL-1)	Macrofage activate	- Eliberare de IL-1, TNF, CSF - Crește abilitatea de răspuns la factori de creștere și de diferențiere, acționând într-un stadiu mai târziu al diferențierii
TNF - $\alpha$ cașectină	Macrofage Limfocite T	- Eliberare de PAF, IL-1, PGE2
IL - 3	Limfocite T	- Rol chemotactic - Creșterea și diferențierea promonocitelor - Crește numărul macrofagelor în circulație și țesuturi
IL - 4	Limfocite T CD 4 <sup>+</sup>	- Activează prezentarea antigenului, exprimarea receptorilor Fc pentru IgE, moleculelor MHC de clasa II, fuziunea celulară
M-CSF	Macrofage Fibroblaste	- Creșterea și diferențierea promonocitelor - Activarea sintezei de urokinază
GM-CSF	Macrofage Limfocite T Celule endoteliale	- Creșterea și diferențierea promonocitelor - Activează pătrunderea monocitelor în țesuturi
IFN - $\alpha$	Leucocite	- Activare antivirală
IFN - $\beta$	Fibroblaste	- Modularea activității macrofagelor
IFN - $\gamma$	Limfocite T	- Activarea funcțiilor antivirale, respiratorii, a exprimării antigenelor MHC de clasa II, scăderea MFR
TGF $\beta$	Macrofage Trombocite	- Eliberarea de factori de creștere, chemotactism crescut

Până în prezent, nu sunt cunoscute modalitățile de control celular al mecanismelor care reglează sinteza și eliberarea produselor secretorii ale macrofagelor și maniera de influențare a acestor evenimente de către diferiți factori ai inflamației, dar se știe precis că aceste produse secretorii joacă un rol important în apărarea organismului.

**Funcțiile citotoxic-citostatice ale macrofagelor** pot fi exercitate asupra unor celule țintă diferite, independent de cele fagocitare. Macrofagele își pot exprima potențialul citotoxic nespecific, selectiv sau specific, în sensul că pot ucide orice fel de celulă străină sau numai anumite celule străine, pe care le pot recunoaște fie selectiv, fie prin mijloace specifice. Citotoxicitatea nespecifică are probabil ca obiectiv distrugerea diferitelor celule îmbătrânite, infectate, transformate, care sunt recunoscute și ucise prin mecanisme dependente sau independente de oxigen. Pentru aceasta este suficient ca celulele efectoare să recepționeze semnale adecvate pentru a fixa și ucide ținta.



*Citotoxicitatea nespecifică* dar selectivă presupune o "selectare" a țintelor și atacarea cu prioritate a celor pentru care macrofagele au o "susceptibilitate" anumită. Ea este efectuată de către macrofagele activate, care devin capabile să recunoască mai activ și să reacționeze la schimbările suferite de celula țintă. Această activare este realizată de diverși modulatori ai răspunsului imun, cum ar fi LPS, muramil-dipeptidul, acidul poliinosinic-policitidilic (poli I:C) etc. Acestea transmit semnale chimice care vor acționa asupra membranei celulare influențându-i compoziția, modul de organizare, starea fizică a lipidelor din compoziția sa și, în final, funcțiile acesteia. Astfel un ligand, care poate induce perturbarea fosfolipidelor de membrană, va contribui la realizarea de semnale transductoare de la exterior spre interiorul celulei. Pe lângă modularea semnalului transductor, starea fizică a dublului strat lipidic poate regla activitatea catalitică a enzimelor membranei, reacțiilor ei de fuziune etc. De exemplu, sub influența endotoxinelor bacteriene, macrofagele primesc un semnal chimic potent biologic de la diferite surse ubicuitare, care le face să capete proprietăți tumoricide și le activează secreția unor molecule cu activitate de stimulare a proliferării lor. Este un mecanism de reglare care le permite controlul proliferării propriilor precursori și, deci, asigurarea numărului necesar de celule pentru realizarea supra-vegherii imune.

Desigur, intervin și factori care pot inhiba activitatea citotoxică, unii dintre ei eliberați de către celula țintă, alții de către alte surse. Astfel, celulele tumorale secretă prostaglandine care au efecte inhibitorii asupra funcțiilor imune și care activează sinteza cAMP. Indometacinul, care inhibă sinteza prostaglandinelor, va activa citotoxicitatea. În țesutul neoplazic, sunt macrofage "asociate tumorii" care pot favoriza proliferarea tumorii prin generarea de vase de neoformație și activitate procoagulantă urmată de depunerea de fibrină. Aceste celule nu produc IL-1 sau TNF. În schimb, macrofagele activate sunt citotoxice, efect manifestat în special ca urmare a producerii de TNF, IL-1, M-CSF și speciilor reactive de oxigen.

*Citotoxicitatea specifică* este realizată de către macrofagele aflate sub influența limfocitelor T. Dovada existenței ei este eliminarea cozii de mormoloc. Aceasta este distrusă de către enzimele lizozomale secretate de către macrofagele care au primit un semnal din partea celulelor care urmează să fie distruse, adică din partea celulelor cozii. Este posibil ca și celulele tumorale sau alte celule transformate să fie capabile să elibereze astfel de semnale care să inducă activarea macrofagelor. Un alt mecanism de citotoxicitate specifică efectuat de către macrofage este cel anticorpo-dependent, în care specificitatea este conferită de către anticorpii anti-celula țintă.

În afară de funcțiile citotoxice, macrofagele au și activitate citostatică, de blocare a creșterii celulelor, în special a celor neoplazice. De fapt, primul efect al macrofagelor asupra celulelor tumorale este cel citostatic, de blocare a multiplicării țintei. Ea intervine în primele 24 de ore, fiind apoi înlocuită de funcția citotoxică. Este necesar un contact direct între macrofag și țintă, contact care să permită fuzionarea lizozomilor cu celula țintă (fig. 44).

În linii mari, sistemele citotoxice ale fagocitelor mononucleare sunt similare celor menționate la granulocitele polimorfonucleare: unele sunt oxigen-dependente iar altele, oxigen-independente. Și unele și altele contribuie la anihilarea agresorului și la menținerea homeostaziei.

**Funcțiile reglatoare ale macrofagelor.** În răspunsul imun, aceste celule intervin ca elemente pivot care recunosc, captează, prelucrează antigenul și-l prezintă în forma sa imunogenă limfocitelor. Ele dețin însă și unele funcții reglatoare care, în linii mari, sunt expresia acțiunii lor directe fie asupra antigenului, fie



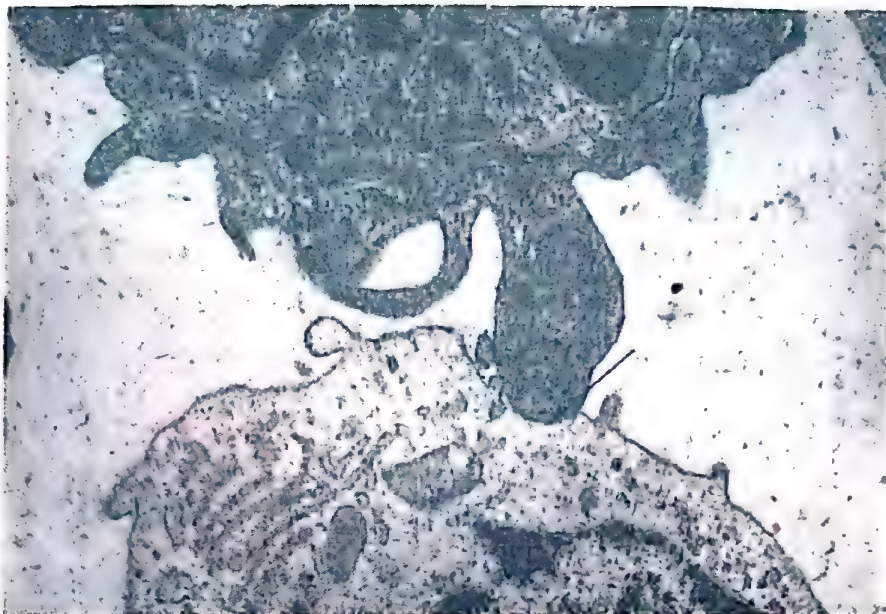


Fig.44. Pentru uciderea celulei ţintă, este necesar contactul intim între celula ucigaşă şi ţintă (săgeata). Microscopie electronică, transmisie directă, 22 000 x.

asupra celorlalte componente ale sistemului imun. Astfel, macrofagele fagocitează non-propriul şi-l elimină din organism anulându-i efectele nocive. Prin digestie moderată intracitoplasmatică, creează "stocuri" de epitopi care realizează un anumit prag de concentraţie, prag care permite declanşarea reacţiilor imune. Cu alte cuvinte, se evită toleranţa de "zonă joasă" datorită insuficienţei stimulului antigenic. Totodată, prin reţinerea antigenului la nivelul fagolizozomilor şi eliberarea lor treptată, se evită "sufocarea" limfocitelor de către stimuli în exces, deci toleranţa de "zonă înaltă".

Asupra celorlalte componente ale sistemului imun acţionează prin eliberarea de mediatori solubili precum şi prin intervenţia unor subpopulaţii de macrofage cu funcţii supresoare care intervin direct în mecanismele de reglare.

Monocitele şi macrofagele aderă selectiv la endoteliul aortei la subiecţii hipercolesterolemici, contribuind la eliminarea parţială a colesterolului, depozitează ioni de Fe, unele ganglioze, lipide etc. Joacă rol de reglator în diferenţierea celulelor hematopoietice, contribuie prin  $TGF\alpha$ - şi  $TGF-\beta$  ("transforming growth factor") la vindecarea rănilor, prin  $TNF-\alpha$  induce angiogeneza, prin NGF ("neural growth factor") creşterea nervilor iar prin fibronectină şi prin condroitin- sulfat reglează formarea matriţelor exocelulare. Aceste celule joacă un rol important în controlul şi reglarea unui număr important de funcţii ale limfocitelor, asupra cărora au efecte activatoare sau supresoare. De exemplu, ele consumă cistină şi generează tiol solubil al cărui constituent major este cisteina. Creşterea concentraţiei de cisteină influenţează puternic activitatea limfocitelor  $T$  citotoxice ( $CD8^+$ ), sinteza ADN etc. Cisteina are un rol reglator asupra răspunsului imun, eliberarea ei de către macrofage în cantităţi variabile contribuind la reglarea funcţiilor limfocitelor din imediata vecinătate. Bineînţeles că acest rol reglator este amplificat de multitudinea de monokine secretate de către aceste celule care conferă proprietăţi imunostimulatoare macrofagelor, atât prin eliberarea de "factori activatori" ai limfocitelor, cât şi prin prezentarea antigenului într-o formă "înalt imunogenă".

Dar, au şi acţiuni supresoare, cu rol important în generarea energiei care însoţeşte competiţia antigenică, infecţiile T.B.C., fungice etc. Macrofagele supresoare sunt prezente la purtătorii de plasmacitoame, fiind foarte active în eliberarea unor factori supresori ca IFN, arginază, prostaglandine, sau alte molecule supresoare.



Sistemul nervos central este bine izolat prin bariera hematoencefalică, motiv pentru care accesul limfocitelor este blocat iar exprimarea antigenelor MHC este aproape nulă. Cu toate acestea, aici au loc reacții imune locale, în special antivirale, celulele care ar putea avea rol de pivot în interacția dintre limfocitele *T* și neuroni fiind astrocitele. Acestea ghidează dezvoltarea axonilor, controlează mecanismele homeostatice, efectuează funcții de prezentare a antigenului, au activitate fagocitară și secretorie. Pot produce enzime, prostaglandine, interleukin-6 și pot prezenta antigenul celulelor *T* sub restricția MHC, proces în timpul căruia devin DR<sup>+</sup> și ICAM-1<sup>+</sup> ca urmare a efectului retroactiv exercitat de celulele *T* asupra lor.

Ar fi două tipuri celulare: tipul 1 poligonal, dominant în sistemul nervos, și tipul 2, mai slab reprezentat. Sunt de origine diferită și se deosebesc între ele prin modul de exprimare a canalelor de Na<sup>+</sup> și K<sup>+</sup>.

Au terminații lungi, care se prelungesc până la celulele endoteliale ale vaselor, prin care transmit semnalele necesare formării joncțiunilor dintre ele și celulele ependimale, oligodendrocite, neuroni etc. Interacțiunile sunt mediate de factori de creștere și molecule de adeziune ca ganglioizide, glicosfingolipide bogate în acid sialic etc. Au receptori pentru apolipoproteina E produsă în creier, norepinefrine, bradikinine, histamine, ATP. Rolul lor încă nu este bine cunoscut.

#### CELULELE LANGERHANS

Derivă din măduva osoasă și au un pronunțat aspect de celule dendritice, deosebindu-se de acestea printre altele și prin prezența granulelor *Birbeck* în citoplasma lor. Datorită faptului că au ATP-ază, esteraze, receptori pentru complement, receptori *Fc*, se aseamănă cu macrofagele, de care se deosebesc prin poziția lor predilectă în organism (în piele).

Stimulează potent limfocitele *T*. Prin cultivare *in vitro*, pierde capacitatea de prelucrare a antigenului fiind, ca și celulele dendritice, inductoare ale răspunsului imun primar, dar nu și secundar. Proaspăt izolate, pot prelucra eficient antigenul în vederea prezentării limfocitelor *T*, fapt ce sugerează că *in vivo* funcțiile lor de celule APC sunt mai complexe.

Au rol central în modularea răspunsului imun față de *Leishmania*, înglobând parazitul și transportându-l către ganglionii limfatici regionali pentru a fi prezentat limfocitelor *T*.

#### CELULELE SERIEI LIMFOCITARE

Sunt celule care recunosc și reacționează cu "non-propriu" prin intermediul receptorilor de membrană pentru antigene. O celulă are receptori care vor recunoaște un determinant antigenic unic, populația limfocitară aparținând la atâtea grupe (clone=ramuri), cu receptori de membrană unici pentru antigen, câți epitopi există potențial în natură. Cele aproximativ 10<sup>12</sup> limfocite existente în organismul uman de exemplu, care reprezintă 1-2% din greutatea corporală

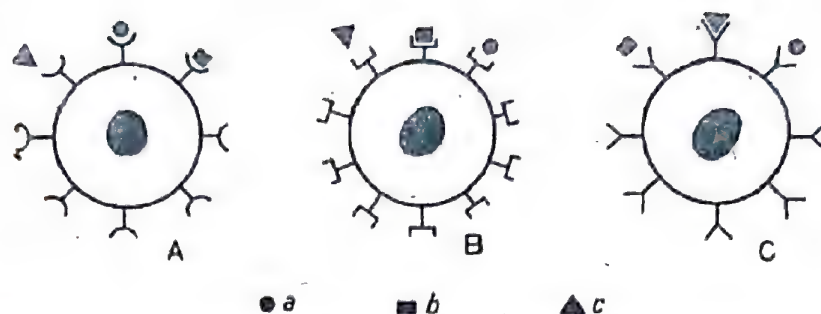


Fig.45. Limfocitele există sub formă de grupe de populații celulare (clone), fiecare având exprimat pe membrana plasmatică un singur tip de receptori pentru un singur epitop. De pildă, limfocitul A are receptori pentru a, limfocitul B pentru b, iar C pentru c. Receptorii limfocitului A nu pot recunoaște și lega epitopii b sau c, cei ai limfocitului B epitopii a sau c etc.

(cca. 700-1 200g), ar aparține la cca.  $10^8$  clone care au receptori pentru epitopi diferiți (fig. 45). O clonă cu receptori pentru un epitop dat poate fi alcătuită din una până la  $10^7$  celule, numărul lor fiind condiționat de intensitatea stimulului antigenic.

În trecut, limfocitele au fost clasificate pe baza unor criterii diferite ca: mărime, susceptibilitatea la corticosteroizi, durată de viață etc. Astfel, sunt limfocite mici ( $6 \mu m$ ) și mari ( $12 \mu m$ ), rezistente sau sensibile la corticosteroizi, cu durata de viață scurtă (de ordinul câtorva săptămâni) sau lungă (de ordinul anilor sau zecilor de ani) etc. Dar, aceste caractere nu întotdeauna sunt expresia unor deosebiri reale care definesc subpopulații celulare diferite, ci doar deosebiri de moment, legate de anumite stadii de evoluție a unei celule. De exemplu, o celulă în diviziune poate apărea ca un "limfocit mare", pentru ca la sfârșitul ei să fie un "limfocit mic". Toate celulele sistemului imun derivă din celula matcă pluripotentă evoluând spre două linii principale de diferențiere: una mieloidă, din care vor descinde fagocitele și alte celule, și alta limfoidă, care va genera cele două clase majore de

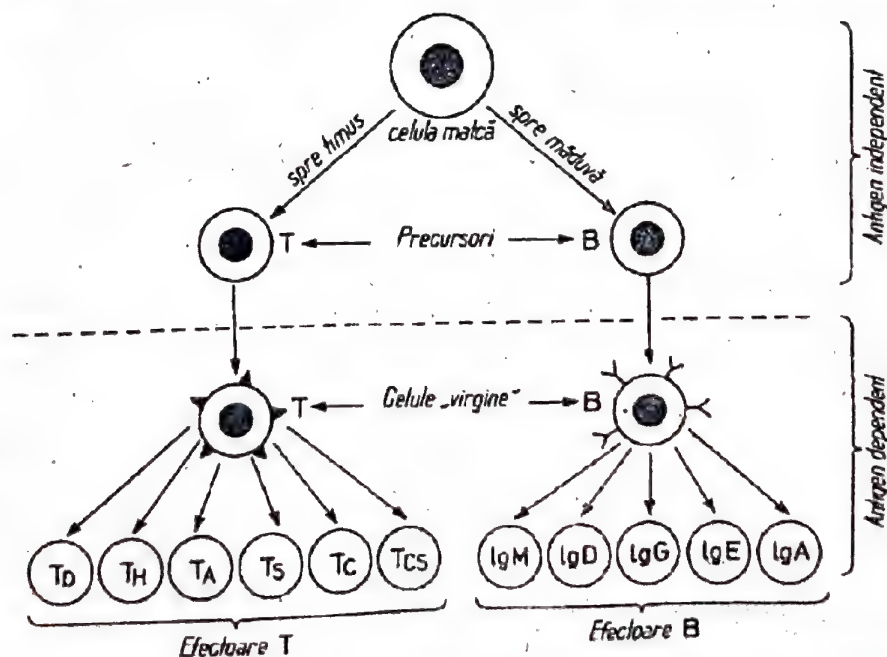


Fig.46. Celulele din seria limfoidă descind din celula matcă pluripotentă funcțional. În primele stadii de dezvoltare, multiplicarea lor se face în absența stimulului antigenic. După exprimarea receptorilor, devin celule imunocompetente T sau B, "virgine", care se vor multiplica numai consecutiv stimulului antigenic.



limfocite, și anume limfocitele *T* și *B* (fig. 46). Celulele *T* se diferențiază inițial în timus, iar cele *B* la păsări în bursa lui Fabricius, iar la mamifere, în timpul vieții embrionare în splină și ficatul embrionar, și în timpul vieții adulte, în măduva osoasă. În afară de aceste două clase, mai există o altă populație care nu are toate caracteristicile limfocitelor *T* sau ale celor *B*, a căror diferențiere este însă insuficient elucidată. Ele ar putea fi de origine mieloidă sau limfoidă, sau pot reprezenta o linie de maturare distinctă sau stadii diferite de maturare. Reprezintă populația de limfocite non-*T*, non-*B*, denumite mai de mult și "clasa a III-a", care se deosebesc de celulele *T* și *B* prin granulele lor intracitoplasmice și alte caractere morfologice și funcționale.

În sângele periferic, la persoanele normale, se găsesc cca.  $1 \times 10^6$  limfocite/ml, valoare constatată după separarea lor prin centrifugare în gradient de densitate. Depășirea semnificativă a acestei valori semnalează existența unei stări patologice, ca de pildă leucemia acută sau cronică. Revenirea spre limite normale a acestor valori la leucemici este un indiciu de ameliorarea stării de sănătate (fig. 47).

Refacerea limfocitelor în sistemul imun este de cca. 5% pe zi. De exemplu, la un șoarece adult, din cele cca.  $10^9$  limfocite *B*, zilnic se regenerează cca.  $5 \times 10^7$  celule care înlocuiesc pe cele cca.  $5 \times 10^7$  celule dispărute.

Dacă morfologic limfocitele *T* și *B* sunt identice, funcțional sunt extrem de eterogene. Ele sunt celule mici, agranulare, cu un raport mare între nucleu și citoplasmă, pe când celulele non-*T*, non-*B* au un raport nucleu/citoplasmă (N/C) mic și conțin granule azurofile intracitoplasmice, din care cauză au fost denumite limfocite granulare mari sau celule LGL ("large granular lymphocytes").

Populațiile de celule mici *T* și *B*, deși sunt similare morfologic, se deosebesc între ele atât funcțional cât și antigenic. Mai mult, chiar în cadrul claselor *T* și *B* există subclase cu proprietăți funcționale și antigenice diferite derivate din precursorii antigen-reactivi ai celulelor efectoare generate în organele limfoide primare și în circulație unde, după ce vin în contact cu antigenul, suferă un alt ciclu de diferențiere, care le orientează spre capacități funcționale distincte.

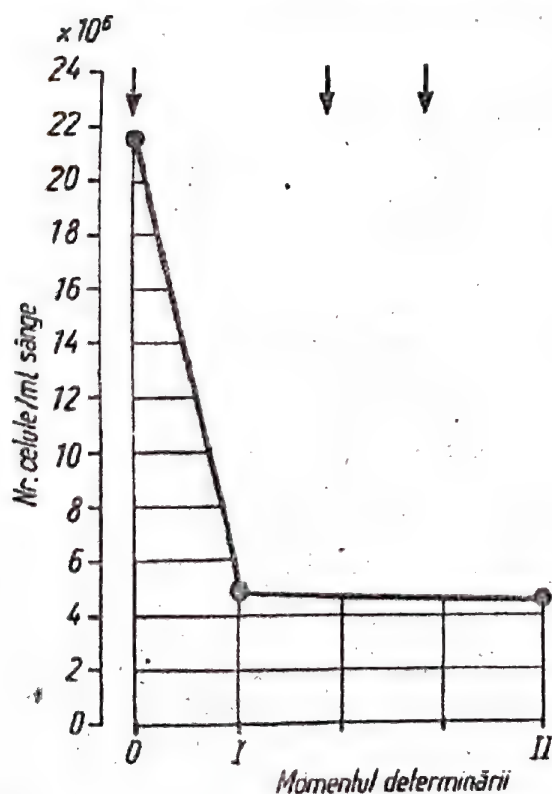


Fig. 47. Dinamica numărului de limfocite/ml de sânge la un pacient cu leucemie limfatică cronică T (LLCT).

Pacientul avea un număr mare de limfocite în circulație (cca.  $22 \times 10^6$ /ml de sânge). După terapia imunomodulatoare cu Cantastim (săgețile), numărul celulelor a scăzut semnificativ, apropiindu-se de valorile normale.

Dezvoltarea celulelor T mature în timus implică schimbări în reglarea unui mare număr de gene, unele fiind represate iar altele activate. Un set important de gene care este exprimat în timus va codifica sinteza și exprimarea receptorilor pentru antigen. Dar această exprimare nu este suficientă pentru ca celula T să devină matură. Pentru aceasta, este necesară exprimarea altor gene, ca de pildă cele care controlează sinteza IL-2, IL-4, IL-5, IFN, perforinelor etc.

În cursul maturării lor, celulele T vor câpăta sau pierde, ca o expresie a depresiei sau represiei genice, o serie de molecule de suprafață care le vor defini din punct de vedere funcțional și antigenic (vezi cap. "Markeri și receptori").

Intratimic suferă două selecții, în cursul cărora sunt eliminați precursorii necorespunzători. Inițial este o selecție "pozitivă" în timpul căreia sunt eliminate celulele care nu pot recunoaște moleculele complexului major de histocompatibilitate (MHC) proprii organului respectiv. Aceste molecule au rol esențial în prezentarea și recunoașterea antigenelor străine de către limfocitele T. Dacă nu pot recunoaște MHC propriu, nu vor fi capabile să recunoască și să neutralizeze antigenul străin, fiind deci nefuncționale.

Urmează o a doua selecție "negativă", în cursul căreia sunt eliminate celulele care recunosc antigenele propriului organism. Eliminarea lor duce la evitarea reacțiilor de autoimunitate. În caz că ar fi tolerate în continuare, aceste celule ar deveni nocive pentru țesuturile organismului din care fac parte. Sunt tolerate și ajung în circulația periferică numai progenitorii care recunosc MHC propriu și antigenele străine (fig. 48).

Deci, din punct de vedere funcțional, limfocitele T, ca de altfel și cele B, se pot afla în următoarele stadii de maturare:

a. *Progenitori sau precursori celulari*, care nu exprimă pe suprafața lor nici un fel de receptori, poate cu excepția receptorilor pentru ecotaxie. Sunt celule foarte tinere, lipsite de funcții, comparabile cu sugarii care mai au mult de crescut și învățat până la maturitate.

Unele dintre aceste celule se găsesc în circulație, aflându-se în drum spre organele limfoide primare, altele se găsesc în interiorul acestor organe, în diferite stadii de maturare (precursori celulari).

b. *Celule virgine sau naive*, care și-au câpătat imunocompetența, deci care pot neutraliza antigenul, dar care încă nu au avut ocazia să-și exercite funcțiile deoarece nu au venit în contact cu acesta.

c. *Celule efectoare*, care au venit în contact cu antigenul și care, după neutralizarea lui, devin celule de memorie, păstrând "amintirea" acestui contact, astfel că, la reîntâlnirea cu același antigen, potențialul lor de reacție este mult sporit.

După câpătarea imunocompetenței în timus, limfocitele T ajung în circulație unde

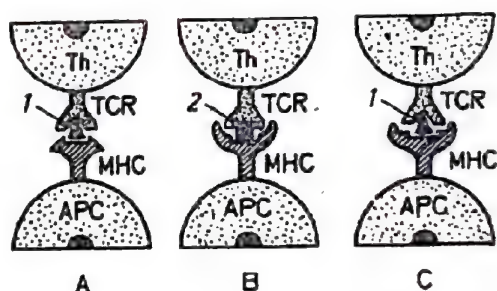


Fig.48. Reprezentarea schematică a modalităților de realizare a "selecției pozitive" și "negative" în cursul educării precursorilor limfocitelor T.

A. În cursul "selecției pozitive" sunt eliminate limfocitele T care exprimă receptori pentru antigen ce nu pot recunoaște moleculele complexului major de histocompatibilitate (MHC) specifice propriului organism, putând recunoaște doar epitopul (1).

B. În cursul "selecției negative" sunt eliminați progenitorii limfocitelor T care recunosc MHC propriu dar și epitopii propriului organism (2). Odată maturate, aceste celule ar genera boli autoimune.

C. Precursorii recunosc epitopul străin (1) și MHC propriu. Celulele sunt acceptate în vederea maturării.



vor îndeplini funcții efectoare (citotoxice, de hipersensibilitate de tip "întârziat" etc.) sau reglatoare (ajutătoare sau "helper", amplificatoare, supresoare, contra-supresoare). Aceste subpopulații, deși identice din punct de vedere morfologic, s-ar distinge din punct de vedere funcțional și antigenic, subpopulațiile cele mai marcante fiind cele ajutătoare ( $CD4^+$ ) și supresoare-citotoxice ( $CD8^+$ ). Unii autori însă nu acceptă existența acestor subpopulații ca entități diferite, susținând că ele nu sunt "linii celulare distincte", ci doar diferite stadii de maturare a aceleiași linii, care poate efectua în fiecare stadiu funcții diferite, solicitând bineînțeles influența unor mediatori solubili diferiți. Se acceptă ideea existenței de celule  $T$  "naive" cu rol supresor și de celule  $T$  de memorie cu rol inductor.

Studiul antigenelor de suprafață cu ajutorul anticorpilor monoclonali a evidențiat existența la șoarece a unei glicoproteine denumită inițial "glicoproteina fagocitară" (Pgp-1) și ulterior Ly-24. S-a constatat că Ly-24 este exprimată atât la unele subpopulații imature  $T$  ( $CD4^-CD8^-$ ) cât și la cele mature ajutătoare ( $CD4^+CD8^-$ ) sau supresoare ( $CD4^-CD8^+$ ), constatându-se că și celulele supresoare au caracterele celulelor de memorie.

De fapt, celulele  $T$  de memorie, adică cele care au derivat din proliferarea clonei consecutiv stimulului antigenic, pot fi identificate cu ajutorul unor determinanți antigenici pe care-i exprimă pe membrana lor și care sunt slab exprimați sau nu sunt exprimați deloc pe membrana celulelor imunocompetente, dar care nu au venit încă în contact cu antigenul, denumite pentru aceasta și celule "naive". Chiar Pgp-1, găsită atât pe suprafața celulelor "mature" sau "de memorie", cât și pe cea a celulelor "imature" sau "naive", este prezentă diferențiat: bine exprimată pe celulele de memorie și slab exprimată pe cele naive.

În afară de diferențele antigenice, între celulele  $T$  "de memorie" și cele "naive" există și deosebiri funcționale (tabelul 30).

Tabelul 30

Diferențe funcționale între limfocitele  $T$  "naive" și "de memorie"  
(după A.N. Akbar și col.)

Funcția	Limfocite $T$	
	Naive	De memorie
Funcția helper pentru producere i.g.	-	++++
Precursor al celulelor citotoxice (antigen-specifice)	+	++++
Precursor al celulelor citotoxice (aloantigen-specifice)	++++	++++
Celule efectoare citotoxice (aloantigen-specifice)	-	++++
Aderența la endotelii	+	++++
Răspuns la stimuli chemotactici	+	++++
Proliferarea indusă de stimuli alogeni	++++	++++
Proliferarea indusă de stimuli mitogenici	++++	+
Inducția funcțiilor supresoare	++++	+

Subpopulațiile de limfocite  $T$  acceptate de către unii sau neacceptate de către alții ca fiind entități funcționale distincte, și nu doar stadii evolutive de dezvoltare a unei populații unice, ar fi limfocitele ajutătoare ( $T_h$ ), amplificatoare ( $T_A$ ), supresoare ( $T_s$ ), contrasupresoare ( $T_{cs}$ ), citotoxice ( $T_c$ ) și de hipersensibilitate de tip întârziat ( $T_D$ ).

**Limfocitele T ajutătoare** ( $T_h$  sau "helper") ajută limfocitele  $B$  sau pe cele  $T$  citotoxice ( $T_c$ ) în exprimarea potențialului lor funcțional. Existența lor a fost demonstrată în cursul unor experimente în care șoarecii iradiați letal, deci cărora li s-a distrus total populația de celule limfoide, erau stimulați cu hematii de oaie în condițiile repopulării organismului lor (reconstituirii) cu diferite populații de celule limfoide. Astfel, dacă după iradierea letală li se injectau limfocite recoltate dintr-un organ limfoid secundar – splină sau ganglioni limfatici – animalele redeveneau capabile să răspundă la stimulul antigenic prin sinteză de anticorpi anti-hematie de oaie. După reconstituirea cu celule timice (precursori  $T$ ), nu reacționau imunologic. De asemenea, nu formau anticorpi anti-hematii de oaie dacă erau reconstituiți cu celule din măduvă osoasă dar, în aceste condiții, redeveneau capabili să sintetizeze anticorpi antipolizaharizi pneumococici. Dacă însă animalele erau reconstituite atât cu celule timice, cât și cu celule din măduva osoasă, ele reacționau imun la stimulii cu hematii de oaie. Ulterior, s-a demonstrat că anticorpii sunt sintetizați de către limfocitele  $B$  și nu de  $T$ , acestora revenindu-le doar rolul de celule ajutătoare pentru  $B$ , de unde și denumirea lor de limfocite  $T_h$ .

O altă dovadă experimentală a existenței subpopulației de limfocite  $T_h$  a fost obținută prin timentomia neonatală care, eliminând limfocitele  $T$ , provoacă depresia răspunsului imun umoral față de antigenele timodependente, dar nu și față de cele timoindependente, dovadă că eliminarea timusului a afectat celulele  $T$ , dar nu și pe cele  $B$ . Dacă acestor animale li se transferă limfocite  $T$ , reactivitatea lor se normalizează, de unde concluzia că limfocitele  $B$  nu pot reacționa la antigenele timodependente decât cu ajutorul celulelor  $T_h$ .

Ar exista două subpopulații de limfocite  $T_h$  care s-ar deosebi între ele atât prin posibilitatea de producere a unor citokine cât și prin caracterul unor funcții de apărare pe care le efectuează (tabelul 31). Aceste tipuri distincte fenotipic sunt denumite celulele  $T_{h1}$  și  $T_{h2}$ , ambele aparținând populației  $CD4^+$ .

Tabelul 31

Tipurile de celule T ajutătoare ( $CD4^+$ ) la șoarece

Tipul celular	Funcția
$T_{h1}$	- Secretă IL-2, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF $\beta$
	- Nu secretă IL-4, IL-5
	- Activează macrofagele în apărarea antiparazitară
	- Activează sinteza anticorpilor IgG2 dar nu IgE
	- Sunt implicate în reacțiile de hipersensibilitate de tip întârziat
	- Sunt activate de către semnalele primite de la virusurile sau bacteriile cu localizare intracelulară
$T_{h2}$	- Secretă IL-4, IL-5, IL-6, IL10
	- Nu secretă IL-2, IFN $\gamma$ , TNF
	- Activează sinteza de IgE
	- Stimulează proliferarea eozinofililor
	- Sunt stimulate de către alergene sau componente parazitare



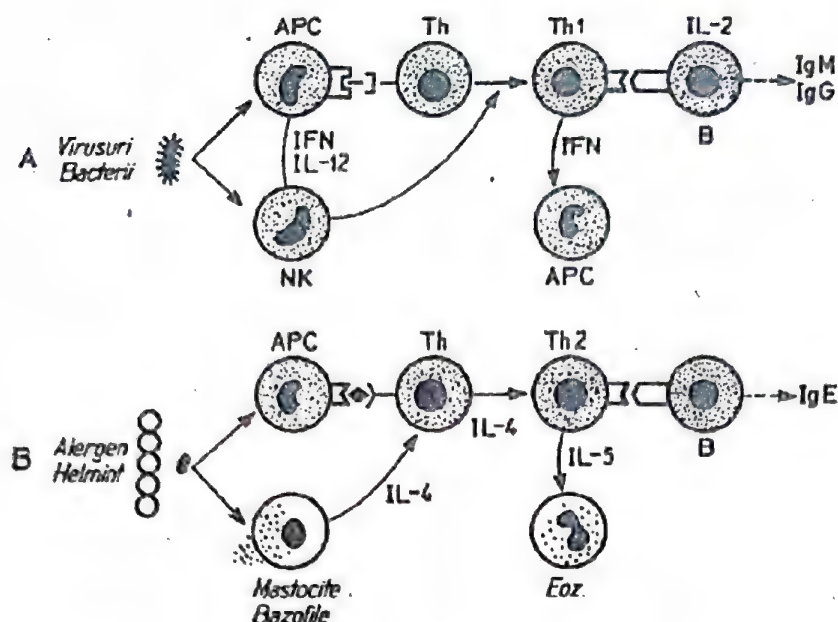


Fig.49. La șoarece ar exista două tipuri de celule ajutătoare T, unele activate de bacterii și virusuri, iar altele de alergene și helminți (după S. Romagnani).

Bacteriile și virusurile cu localizare intracelulară antrenează în răspunsul imun limfocitele de tip  $T_{H1}$ , pe când alergenele și unele componente ale helminților promovează diferențierea fenotipului  $T_{H2}$  (fig. 49). La om nu a fost dovedită cu certitudine existența acestor două tipuri de limfocite ajutătoare, ele producând atât IL-2 și  $IFN\gamma$  cât și IL-4, IL-5, adică întreaga paletă de molecule care sunt produse de diferite populații Th de la șoarece.

De altfel, nici la șoarece diferența dintre cele două tipuri celulare nu pare a fi absolută, deoarece au fost identificate clone care secretă atât IL-2 cât și IL-5. Este posibil ca aceste clone "hibride" să fie precursori ale subpopulațiilor  $T_{H1}$  și  $T_{H2}$  care ar reprezenta stadiile finale de diferențiere a celulelor T ajutătoare.

De altfel, această populație de limfocite T ajutătoare poate fi divizată, după cum menționam anterior, în celule naive ( $T_{H0}$ ), efectoare și de memorie. Dintre cele efectoare, sunt limfocitele  $T_{H1}$  care intervin în răspunsul imun mediat celular și umoral, și  $T_{H2}$  cu rol în declanșarea proceselor inflamatorii și de hipersensibilitate (tabelul 32; fig.50).

Tabelul 32

Principalele subseturi de limfocite  $CD4^+$  murine (după F. Powrie și R. L. Coffman)

Funcția	Subsetul celular		
	$Th_1$	$Th_2$	$Th_0$
Ajutătoare pentru B	+	++	++
Ajutătoare pentru sinteza IgE	-	++	+/-
Activarea macrofagelor	++	-	?
Rol în hipersensibilitatea de tip întârziat	++	-	?

Funcția	Subsetul celular		
	Th <sub>1</sub>	Th <sub>2</sub>	Th <sub>0</sub>
Sintetizează: - IL-2	++	-	+
- IFN $\gamma$	++	-	++
- TNF $\beta$	++	-	?
- TNF	++	+	?
- GM-CSF	++	+	+
- IL-3	++	++	++
- IL-4	-	++	++
- IL-5	-	++	++
- IL-10	-	++	++
- IL-13	-	++	?

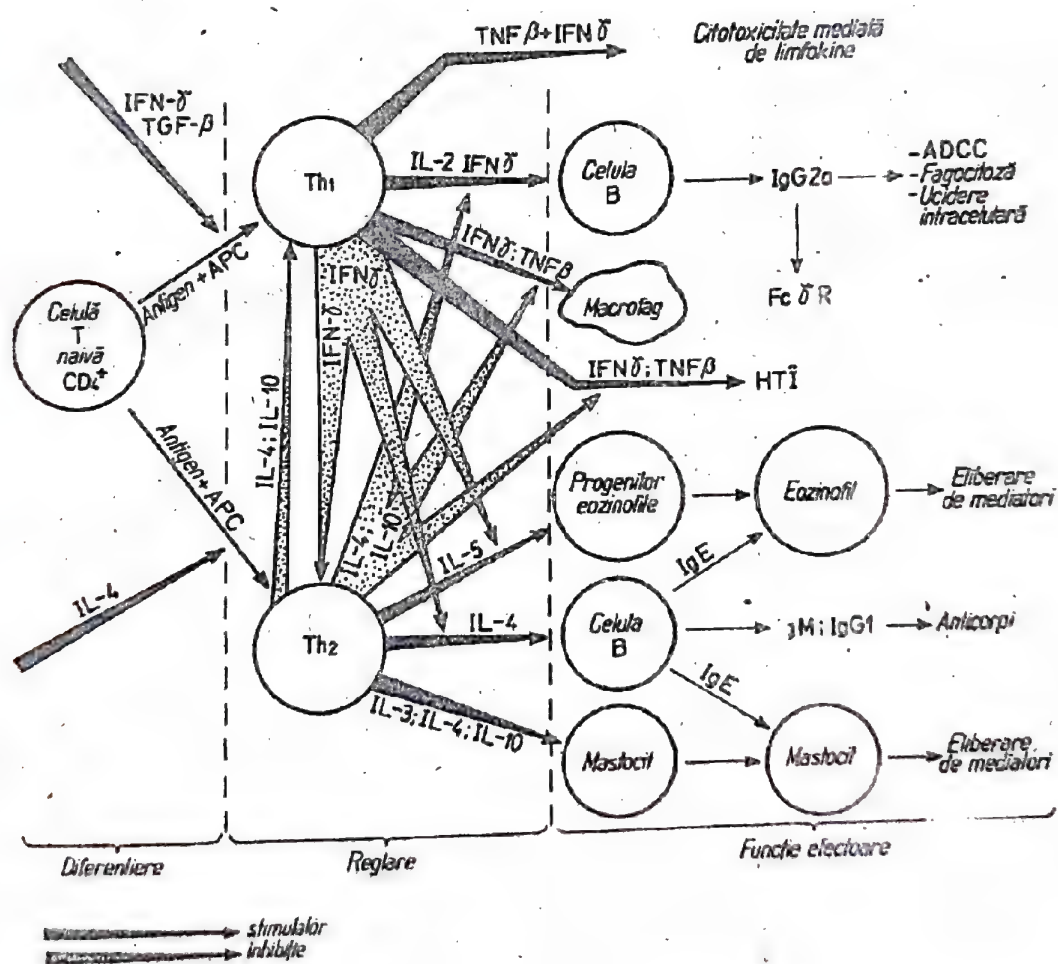


Fig.50. Principalele funcții și inducitori care acționează asupra subclaselor Th<sub>1</sub> și Th<sub>2</sub> (după F. Powrie și R.L. Coffman).

Controlul acestor celule are loc la nivelul a trei stadii evolutive diferite: diferențiere; reglare și funcție efectoare.



**Limfocitele T amplificatoare ( $T_A$ )** ale răspunsului imun au fost puse în evidență în circulația sangvină a șoarecilor în primele două-trei săptămâni de la naștere. Dacă șoarecii *Nu/Nu*, atimici congenital, sunt stimulați cu antigene timo-independente, ca de pildă polizaharizi pneumococici, răspunsul imun umoral se situează la cote normale, deoarece aceste antigene nu solicită și prezența limfocitelor *T*. În cazul în care animalele primesc și limfocite recoltate din circulația sangvină (dar nu din organele limfoide secundare) a șoarecilor tineri, titrul anticorpilor antipolizaharidici crește semnificativ. Această activare a răspunsului imun demonstrează că animalele *Nu/Nu* au primit limfocite  $T_A$  și mai demonstrează că în circulația sangvină a șoarecilor limfocitele *T* supresoare ( $T_s$ ) sunt fie puține numeric, fie încă nu sunt funcționale. Limfocitele  $T_A$  activează selectiv diferențierea și multiplicarea celulelor *B*, care exprimă anumiți receptori de membrană pentru antigene, făcând ca răspunsul imun față de anumite anti-gene simple să fie dominat de anticorpi cu anumite caractere idiotipice. De exemplu, moleculele de anticorpi antifosforil-colină din serul șoarecilor BALB/c sunt dominate de idiotipul *T15*, deoarece precursorii limfocitari purtând acest idiotip au fost amplificați funcțional de către  $T_A$ , care a acționat selectiv pe anumite clone deja activate de către limfocitele  $T_h$ .

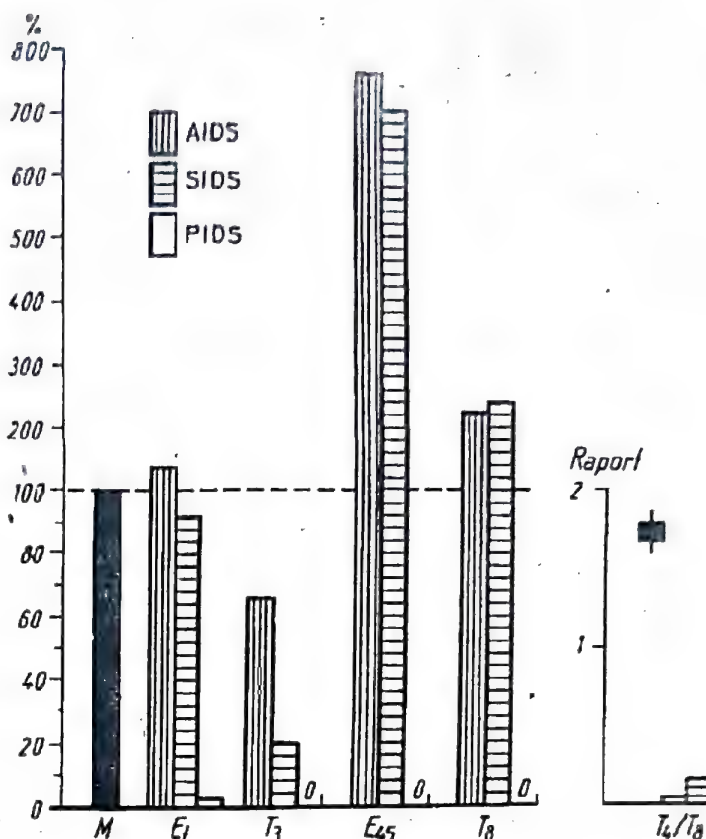
**Limfocitele T supresoare ( $T_s$ )** au rol important în reglarea răspunsului imun, deoarece mențin în granițe normale intensitatea reacțiilor imune și, implicit, proliferarea celulelor limfoide. Existența acestor celule a putut fi demonstrată prin experimente *in vivo* și *in vitro*. Se știe că șoarecii *Nu/Nu* pot sintetiza anticorpi antihematie de oaie numai dacă primesc limfocite  $T_h$  din splina șoarecilor adulți normali. În cazul antigenelor timo-independente, nu au nevoie de transfer de limfocite *T*. Dacă totuși primesc limfocite din splină sau din ganglionii șoarecilor adulți normali, răspunsul la antigenele timo-independente este inhibat deoarece, pe lângă celulele  $T_h$ , de care în cazul acestor stimuli nu era nevoie, animalele au primit și celule  $T_s$  care au supresat reacțiile imune, eliberând nu semnale "pozitive", ca în cazul  $T_h$ , ci semnale "negative". Dacă se amestecă *in vitro* limfocite recoltate de la persoane cu leucemie limfoblastică *T* cu limfocite de la persoane normale, răspunsul limfocitelor la un stimul cu PWM sau PHA este slab, proliferarea celulară fiind cu mult sub nivelul celei înregistrate în cazul stimulării celulelor recoltate de la subiecți normali. Dacă, însă, celulele leucemicilor au fost distruse prin iradiere sau prin tratare cu ser anti-limfocite  $T_s$  (*CD8*), răspunsul la mitogene atinge valorile normale. De asemenea, limfocitele șoarecilor care în mod "normal" nu răspund la un stimul cu tripolimerul GAT (glutamină+albumină+tirozină) devin reactive după tratarea lor cu un ser antilimfocite *T* de șoarece (anti *Thy-1*). Și într-un caz și în celălalt, celulele și-au recăpătat potențialul reactiv normal deoarece prin iradiere sau prin tratament cu ser antilimfocitar au fost distruse limfocitele  $T_s$  care "frânau" răspunsul imun.

Ar exista un adevărat circuit "*T* supresor" generat de niște celule "inductoare" ale supresiei ( $T_{si}$ ) care ar acționa asupra precursorilor  $T_s$ , ambele tipuri de celule fiind radiosensibile. Circuitul *T* supresor ar fi compus din trei seturi de celule  $T_s$ :  $T_{s1}$ ,  $T_{s2}$  și  $T_{s3}$  care ar intra în funcție secvențial, următoarea celulă fiind activată de precedentă fie direct, fie prin mediatori solubili sau "factori de inducere a supresiei".

Circuitele supresoare, deși universale, pot adopta căi diferite de exprimare care ar condiționa calitatea de "reactant" sau "nereactant" la un antigen dat. La animalele nereactante activarea  $T_s$  poate fi extrem de rapidă și, deci, "frânarea" răspunsului imun maximă, pe când la cele reactante, activarea ar fi lentă. Se pare că și recunoașterea antigenului s-ar face diferit în cazul limfocitelor  $T_s$  care, spre



Fig.51. Procentul de limfocite  $T$  (întreaga populație de limfocite  $T$ ), de  $T$  supresoare ( $E_{45}$ ) și raportul  $Th/Ts$  exprimat ca  $T_4/T_8$  la bolnavi cu AIDS, cu imunodeficiente induse accidental (SIDS) sau cu atimie congenitală (PIDS). Valorile sunt raportate procentual la valorile normale ( $M$ ), considerate arbitrar ca fiind egale cu 100. Se observă absența totală a limfocitelor  $T$  la PIDS, valori aproape normale ale populației  $T$  totale atunci când au fost identificate prin metoda rozetelor  $E$  ( $E_t$ ), dar mult mai scăzute atunci când au fost identificate cu anticorpi monoclonali  $CD3$  ( $T_3$ ). Procentul limfocitelor  $Ts$  este cu mult peste valorile normale, raportul  $Th/Ts$  foarte scăzut (cca. 0,36) reflectând distrugerea celulelor  $Th$ .



deosebire de cele  $Th$  sau  $B$ , îl pot recunoaște independent de MHC, celula APC reprezentându-l limfocitelor  $Ts$ , ci probabil celor  $Tsi$ . Limfocitele  $Ts$  ar interveni în competiția antigenică de tip secvențial, în diminuarea funcțiilor citotoxice ale celulelor care au astfel de funcții, în inducerea paraliziei de zonă joasă etc. De exemplu, între două antigene inoculate la un anumit interval de timp, deci secvențial, există o competiție.

Răspunsul imun față de cel de al doilea antigen este mai slab, deoarece primul inoculat a mobilizat, în afară de celulele efectoare, și celulele supresoare, astfel încât în momentul inoculării, care este critic pentru instalarea competiției antigenice, al doilea antigen găsește deja un prag crescut de celule  $Ts$  care inhibă funcțiile limfocitelor din clona cu receptori pentru antigenul respectiv. Dintre factorii care favorizează proliferarea și activarea funcțională a limfocitelor  $Ts$  sunt: dozele mici de antigen, persistența prelungită a antigenelor în organism, incapacitatea macrofagelor de a capta sau prelucra antigenul etc.

La oamenii sănătoși, raportul dintre limfocitele  $Th$  și cele  $Ts$  este de 1,5-2, adică există cca. două limfocite  $Th$  la o celulă  $Ts$ . În unele boli, acest raport poate fi puternic modificat (fig. 51).

**Limfocitele  $T$  contrasupresoare ( $Tcs$ )** contracarează activitatea celor  $Ts$ , acționând sinergic cu celulele efectoare ale răspunsului imun sau cu cele  $Th$ . În declanșarea funcțiilor  $Tcs$  ar interveni o cascadă de activități secvențiale care ar activa inițial o populație de celule  $T$  inductoare ale contrasupresiei ( $Tics$ ) care, la rândul lor, vor activa o altă populație de celule  $T$  traducătoare a contrasupresiei ( $Tcst$ ), ce va traduce semnalul și va declanșa funcțional celulele  $Tcs$ . Acestea, cel puțin ca speculație teoretică, fie că vor acționa asupra celulelor  $Ts$  suprimându-le activitatea și deblocând efectul inhibitor pe care-l exercită asupra celulelor țintă  $T, B$  etc., fie că vor acționa direct asupra țintei activând-o funcțional.



**Limfocitele T citotoxice** acționează direct și specific asupra celulelor alogene cu complex MHC diferit de cel propriu, precum și asupra celor singene modificate datorită unor infecții virale, procese neoplazice etc., lizându-le. Limfocitele T<sub>c</sub> acționează asupra țintei, respectând legile de bază ale răspunsului imun, și anume: recunoașterea specifică a epitopilor de pe suprafața celulei țintă prin receptori de membrană pentru antigen, proliferarea clonală, apariția celulelor de memorie etc. Pentru ca efectul citotoxic să poată avea loc, este necesară existența unui contact direct între celula T<sub>c</sub> și țintă, uciderea făcându-se în absența anticorpilor și complementului. Procesul citotoxic recunoaște mai multe faze distincte, și anume: a) recunoașterea celulei țintă și atașarea prin receptori de membrană la ea (proces obligatoriu, uciderea neputând fi realizată la distanță); b) activarea mecanismelor litice; c) lansarea loviturii letale și d) desprinderea de ținta ucisă.

Se pare că numai prima fază, cea a contactului intim dintre celule este specifică, celelalte fiind procese nespecifice. Activarea precursorului T<sub>c</sub> implică existența stimulului antigenic la care să fie asociate semnale trimise de limfocite T<sub>h</sub> fie prin contact direct, fie prin mediatori solubili sub restricția antigenelor MHC. Deci, ca și în cazul limfocitelor B, pentru a-și exercita activitatea, celulele T<sub>c</sub> solicită intervenția reglatoare a limfocitelor T<sub>h</sub> și T<sub>s</sub> precum și alte forme de cooperare celulară.

În infecțiile virale, anticorpii sunt importanți deoarece neutralizează virionii care se află extracelular, adică atunci când părăsesc celula infectată și pleacă spre alta normală pentru a o infecta. Odată ajunși intracelular, ei nu mai pot fi "văzuți" de anticorpi, de acum încolo rolul major în apărare revenind limfocitelor T<sub>c</sub>. Acestea recunosc proteina virală inserată în membrana celulei gazdă pe care o ucid, punând în imposibilitate multiplicarea și, implicit, difuzarea lor în organism. Așa se explică de ce limfocitele T<sub>c</sub> au rol benefic în infecțiile cu virusul Epstein - Barr, cu virusul citomegalic, în hepatitele virale, pneumopatii etc.

**Limfocitele T de hipersensibilitate de tip întârziat (T<sub>D</sub>).** Celulele care pot transfera starea de hipersensibilitate de tip întârziat de la un subiect la altul sunt limfocitele T<sub>D</sub> care, o dată ce au fost sensibilizate la un antigen, produc reacții, cunoscute sub denumirea de "tip întârziat" datorită în principal capacității lor de a recruta alte tipuri de celule la locul reacției față de antigenul respectiv. Ele sunt lipsite de antigene MHC, solicită aportul limfocitelor T<sub>h</sub>, iar după contactul cu antigenul, eliberează limfokine care atrag macrofagele și alte celule care vor amplifica reacția locală.

#### CLAȘA LIMFOCITELOR B

Derivă din celulele educate în măduva osoasă la mamifere sau bursa lui Fabricius la păsări. Caracteristica lor majoră o constituie natura imunoglobulinică a receptorilor pentru antigen în cazul celulelor virgine sau de memorie și secreția imunoglobulinelor cu funcție de anticorpi în cazul celulelor efectoare (plasmocitelor). Diferențierea limfocitelor B în cursul evoluției de la progenitor până la plasmocit este controlată, ca și în cazul limfocitelor T, de factori independenți de stimulul antigenic, care conduc precursorul până la stadiul de celulă imunocompetentă, după care intervine antigenul care va orienta celula spre plasmocitul efector.

Precursorii derivă din hemocitoblast; aflați la periferia măduvei osoase migrează spre centrul ei, unde exprimă molecule de adeziune și vin în contact cu



rețeaua de celule dendritice reticulare. Aici, dintr-un precursor derivă cca. 64 de progenitori, dintre care vor supraviețui numai cei care și rearanjează eficient linia germinativă și care se acumulează în spațiile sinusoidale, aproape de sinusul central de unde trec în circulație ca celule virgine (fig. 52). Marea lor majoritate mor (la oaie peste 95%) fiind rapid fagocitate.

La nivelul măduvei, precursorii sunt supuși primei selecții la care rezistă un număr redus, care sintetizează intracitoplasmatic lanțul  $\mu$  și apoi  $L$ , ulterior lanțul  $\delta$  și care, în final, exprimă receptorii IgM și IgD (vezi "Receptorii de membrană pentru antigen"). Ajung în circulație ca celule virgine, sunt supuși la o a doua selecție, majoritatea lor având viață scurtă, fiind omorâți și depozitați în splină. Precursorii  $\mu^+$  și  $\delta^+$  care au rezistat ajung în ariile  $B$ -dependente din ganglioni și splină unde trăiesc 6-8 săptămâni după care, dacă nu întâlnesc antigenul, mor, fiind înlocuiți cu alte celule virgine și imunocompetente. Dacă întâlnesc antigenul pentru care au receptori, celulele suportă cea de a treia selecție în care au loc hipermutații somatice cu evoluție spre plasmocite și celule de memorie.

După unii, pentru a se menține, celulele de memorie au nevoie de stimul antigenic repetat, în caz contrar, fiind înlăturate din organism în decurs de 10 zile. Deci, nu ar fi celule "cu viață lungă". Alții susțin că ar fi totuși celule cu viață lungă și că nu s-ar regenera prin episoade activatoare realizate de antigen. Dar, nu este exclus ca aceste episoade să fie realizate de către celulele dendritice foliculare care formează o adevărată rețea la nivelul organelor limfoide secundare și care, fixând antigenul, ar putea genera un stimul cronic.

Celulele care evoluează spre plasmocit încep să-și dezvolte mașinăria de sinteză a anticorpilor: își pierde receptorii de membrană, își dezvoltă reticulul endoplasmic și aparatul Golgi care este implicat în glicozilarea imunoglobulinelor, crește numărul poliribozomilor liberi din citoplasmă etc. Celula devine "plasmocit" secretor, caracterizat printr-un reticul endoplasmic bogat, dispus sub formă de canale paralele care se dilată ca niște "cisterne" atunci când sunt pline cu molecule

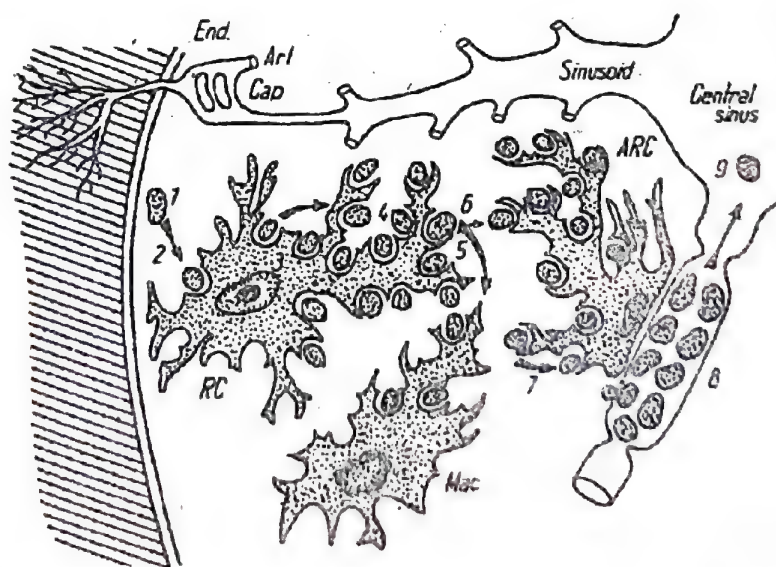


Fig.52. Schema genezei limfocitelor B. Precursorii limfocitari B se diferențiază în secvențele numerotate de la 1 la 8, după care părăsesc organul limfoid central prin sinusul central (9). ARC=celulă reticulată adventicială; Art=arteriolă; Cap=capilar; Mac=macrofag; End=endoperiost (după R.B. Gallagher și D.G. Osmond).



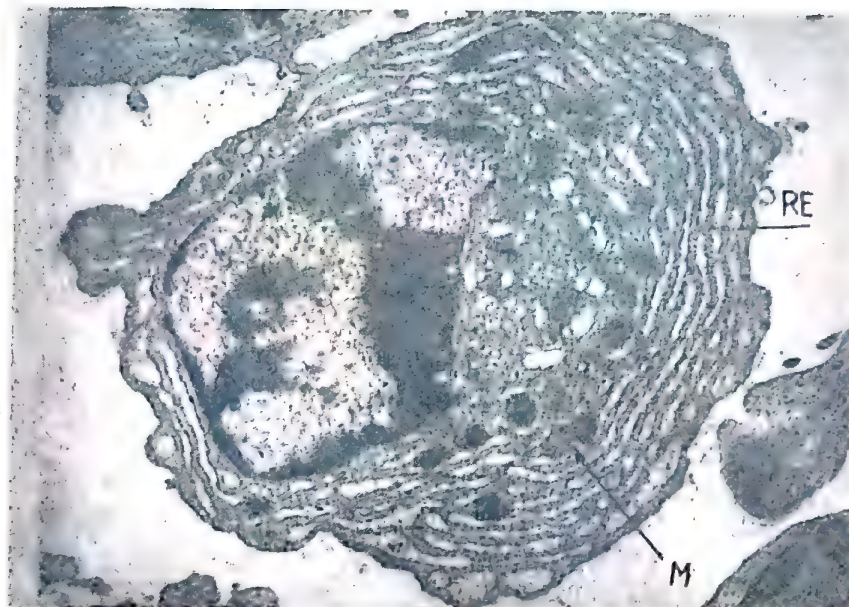


Fig.53. Imaginea unui plasmocit. Se observă numeroase mitocondrii (M) și cisterne ale reticulului endoplasmic (RE) puternic dezvoltate (microscopie electronică, transmisie directă, 10 800 x).

de imunoglobulină (fig. 53). Un plasmocit sintetizează o singură clasă de Ig, în populația limfoidă existând subpopulații de celule B care vor sintetiza diferite clase de anticorpi. Prin tehnica "plajelor hemolitice" celula secretoare poate fi identificată *in vitro*, deoarece atunci când este stimulată cu hematii de oaie secretă anticorpi care se fixează pe eritrocitele din mediu și care, în prezența complementului sunt lizate, zona apărând clară, transparentă (fig. 54).

În afară de funcțiile secretorii, a fost semnalată existența limfocitelor B supresoare și cea a limfocitelor B care prezintă antigenul limfocitelor T, cu referire specială a moleculelor care nu sunt internalizate și prelucrate de către celulele B cu funcție APC.

Deci, limfocitele B pot interveni în procesele de reglare a răspunsului imun.

Distribuția lor în organele limfoide este diferită și întrucâtva opusă distribuției limfocitelor T, în sensul că, în organul în care populația T este mai săracă, predomină populația B și invers (tabelul 33).

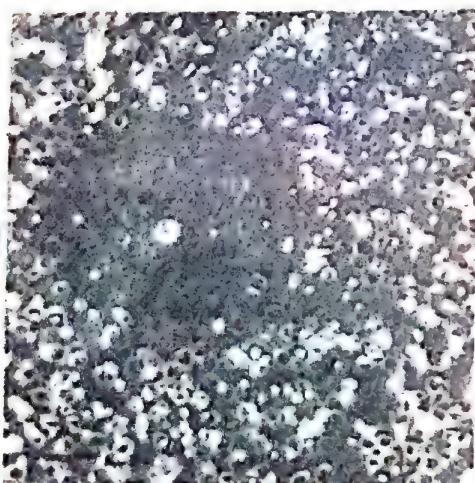


Fig.54. Imaginea la microscopul fotonic a unei "plaje hemolitice". În centrul zonei clare de hemoliză este un plasmocit - formațiunea de culoare albă - care a secretat anticorpi antihematie de oaie. Anticorpii au difuzat în mediu, s-au fixat specific pe hematiile înglobate într-un strat de agar moale și, după acoperirea plăcii cu ser normal de cobai ca sursă de complement, le-au lizat.

Distribuția limfocitelor T și B în diferite organe limfoide și în sângele periferic

Organul limfoid	Celule prezente %	
	T	B
Timus	100	0
Măduva osoasă	0	100
Canal toracic	80 - 90	4 - 10
Ganglioni limfatici	60 - 80	20 - 35
Splină	30 - 50	50 - 60
Plăci Peyer	30 - 35	60 - 70
Sânge periferic	60 - 80	5 - 20

## CELULELE NK

*Celulele NK*ucid fără restricție MHC celule tumorale, în special cele de origine medulară (leucemice), celule infectate viral sau bacterian și chiar bacterii izolate. Reprezintă o linie importantă și primordială de apărare a organismului, pe care-l ajută să rejeteze celulele modificate sau chiar alogrefele, cu rol reglator asupra celulelor hematopoietice în general și a limfocitelor B în special. Secretă diferite limfokine, mai ales după stimularea cu imunomodulatori care controlează creșterea și diferențierea limfocitelor B și a altor populații limfocitare, contribuind la eliminarea precursorilor celulari inutili.

Sunt celule cu viață scurtă, rapid înlocuite cu altele nou formate, prezente în circulație și în organele limfoide ale mamiferelor, aparținând la o subpopulație limfocitară distinctă numită LGL (celule granulare mari="large granular lymphocytes") a căror caracteristică morfologică principală este existența granulelor azurofile citoplasmatic. Celulele acestei populații nu aderă la suprafețe, au receptori *Fcγ* dar nu au receptori pentru complement și nu au imunoglobuline de suprafață. Dar nu toate celulele LGL sunt celule NK, acestea din urmă având unele caractere antigenice de membrană proprii atât celor descendente din seria mieloidă cât și celor din seria limfoidă. De exemplu, celulele NK umane exprimă pe suprafața lor unii markeri antigenici caracteristici celulelor LGL (*CD3-LGL*), limfocitelor T (*CD2;CD8*) și mielomonocitelor (*CD 11*). În consecință, este posibil ca populația NK să derive din linia limfocitară T, ipoteza fiind susținută de caracterele fenotipice și funcționale, specifice celulelor T (markeri *CD2*, *CD4*, capacitatea de a forma rozete E, de a produce IL-2 etc.) dar, la fel de bine este posibil să derive din seria mieloidă; au markerul *CD11*, secretă IL-1 și TNF secretate și de celulele mioide etc.

În orice caz, așa după cum rezultă și din tabelul 34, există asemănări și deosebiri în ce privește exprimarea unor antigene pe membrana plasmatică a celulelor NK și T, tinere sau mature funcțional. Probabil că la aceste două populații celulare intervin unele mecanisme diferite care le controlează unele funcții sau



exprimarea unor antigene. De exemplu, celulele *T* tinere sau adulte exprimă bine lanțurile  $\gamma$   $\delta$  și  $\epsilon$  ale CD3. La *NK*, aceste lanțuri lipsesc deși transcrierea sintezei lor este prezentă, de unde concluzia că aceste celule sunt incapabile să le rearanjeze într-o manieră funcțională. Așa se explică de ce lanțurile  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , există intracitoplasmatic la *NK* tinere, dar nu se regăsesc la celule adulte.

Tabelul 34

Antigene exprimate pe membrana celulelor *NK* și *T*  
(după L.L. Lanier și col.)

Antigenul	<i>NK</i>		<i>T</i>	
	Fetale	Adulte	Fetale	Adulte
CD1	-	-	+	-
CD2	+	+	+	+
CD3 $\gamma, \delta, \epsilon$	+	-	+	+
mCD3 $\gamma, \delta, \epsilon$	-	-	+	+
TCR	-	-	+	+
CD4	-	-	+	+
CD5	-	-	+	+
CD7	+	+	+	+
CD11a/CD18	+	+	+	+
CD11b/CD18	+	+	-	+
CD16(Fc $\gamma$ RIII)	+	+	-	+
CD29	+	+	+	+
CD38	+	+	+	+
CD44	+	+	+	+
CD45RA	+	+	+	+
CD45RO	-	-	+	+
CD56	+	+	-	+
CD57	-	+	-	+
LECAM-1	+	+	+	+

mCD3=marker exprimat pe membrana citoplasmatică; TCR=receptor pentru antigen exprimat pe limfocitele *T* și specific acestora.

Prin secreția unor citokine, celulele *NK* reglează hematopoieză și asigură protecție timpurie a organismului deoarece, în ontogenie, ele se dezvoltă înaintea limfocitelor *T*. Faptul că sunt prezente la șoarecii atimici *Nu/Nu* demonstrează că aceste celule se maturează independent de timus, deși sunt prezente în acest organ într-o proporție foarte redusă (0,1%).

Populația *NK* recunoaște și leagă spontan ținta (fig. 55) pe care o ucide în câteva ore, deosebindu-se din acest punct de vedere de limfocitele *Tc*, cu toate că ambele realizează procesul litic parcurgând aceleași etape: a) recunoașterea

și "legarea" țintei; b) activarea mecanismelor litice; c) lansarea loviturii litice și d) desprinderea de pe celula țintă.

Deși celulele *T* și *NK* mature sunt populații distincte, se pare că totuși ar avea un progenitor comun, descendenții din acesta, în stadiile ulterioare de diferențiere evoluând fie spre celule *NK*, fie spre limfocitele *T* (fig. 56). Celulele *NK* la fetus sunt prezente în ficatul embrionar, de unde ajung în circulație, unde reprezintă 1-5% din totalul limfocitelor. Se găsesc în majoritatea țesuturilor și organelor, dar au o distribuție diferită de cea a limfocitelor *T* și monocitelor (tabelul 35).



Fig.55. Celule *NK* umane (1) recunoscând și atașându-se la celule eritroleucemice umane din linia K562 (2), în vederea uciderii lor

Tabelul 35

Prezența celulelor *NK*, limfocitelor *T* și monocitelor (*M*) în circulație și în diferite organe limfoide

Organul	Celule		
	<i>NK</i>	<i>T</i>	<i>M</i>
Sânge	+++	+++	+++
Timus	-	+++	-
Măduva osoasă	±	-	+++
Canal toracic	-	+++	-
Ganglioni limfatici	±	+++	+
Splină	+++	+++	+++

Notă: +++; ++=bine exprimat; +- =foarte slab exprimat; - =absent

Existența și nivelul funcțiilor *NK* sunt influențate de o serie de factori, cum ar fi determinismul genetic, vârsta, imunoglobulinele, unele citokine, medicamente, alimente, boli, stres etc. (fig. 57). Vârsta influențează existența acestui tip de celule, la oamenii bătrâni activitatea lor putând fi mai scăzută comparativ cu cea de la adulți. La șoarece, apar la 4-5 săptămâni după naștere și dispar la cca. 12-16 luni. Determinismul genetic este evident. De exemplu, unele tulpini de șoarece (*Nu/Nu*; *CBA*; *C3H*; *C57 Bl*) au o activitate crescută, altele însă, au această activitate foarte scăzută (*A*; *L*; *CA*; *S7*; *Beige*). La om, unii subiecți au o activitate *NK* constant ridicată, alții constant scăzută iar alții oscilantă: uneori nivelul acestei funcții este crescut, alteori, scăzut (tabelul 36). Unii au emis ipoteza că recunoașterea celulelor alogene de către efectoarele *NK* este condiționată de exprimarea pe suprafața lor a moleculelor complexului major de histocompatibilitate (*MHC*) de clasa I (vezi capitolul "Complexul Major de Histocompatibilitate"). O reducere a exprimării lor, ca urmare a mutațiilor survenite datorită infecțiilor virale sau unor factori fizico-chimici, ar face celulele susceptibile la liza *NK*. Dimpotrivă, o activare a exprimării acestor molecule ar conferi rezistență celulelor țintă. Ipoteza, deși atrăgătoare, nu a fost confirmată experimental până în prezent.



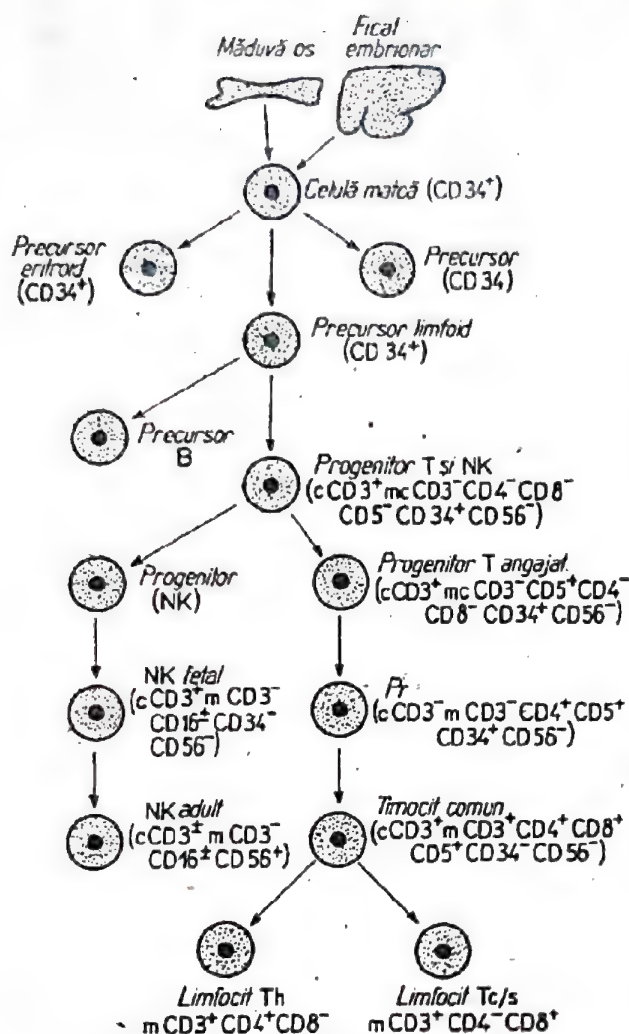
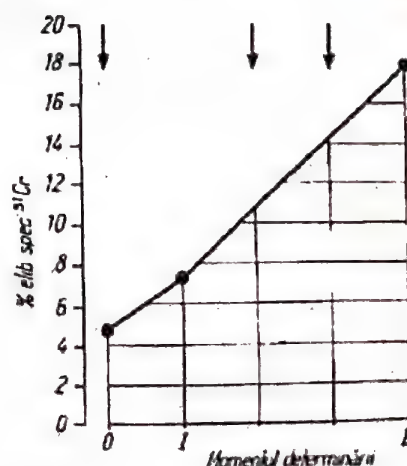


Fig.56. Ipoteză privind descendența celulelor NK. Din măduva osoasă sau ficatul embrionar se generează celula matcă, din care vor descinde precursorii limfoizi B și cei limfoizi T. Din linia T se vor detașa precursorii NK. Atât descendenții T cât și cei NK vor prezenta "modulații antigenice" pe tot cursul maturării lor.

Acest determinism genetic poate fi influențat de o serie de factori sau boli, în special de cele neoplazice. Prostaglandinele, corticosteroizii, radițiile, histamina, teofilina, diverși mediatori care stimulează producția cAMP și a prostaglandinelor inhibă activitatea NK. Alții, ca de pildă IL-2, interferonii, Poli I:C, acidul retinoic, diverși imunomodulatori de genul BCG, Cantastim etc. activează funcțiile citotoxice nespecifice. De fapt, mulți agenți biologici au rol reglator asupra acestor funcții. Este cazul imunoglobulinelor sau al prostaglandinelor, în special al PGE<sub>2</sub> care activează maturarea precursorilor NK. În unele situații, efectul asupra celulelor NK *in vitro* este aparent, putând genera confuzii. De exemplu, se susține că proteina A stafilococică (SpA) activează funcțiile litice ale acestor celule dar, în realitate, această activare este dată nu de SpA ci de unele impurificări ale acestui preparat.

Recundașterea țintei ar fi mediată de diverse molecule ca lamina, CD2, CD16, și LFA-1, deși nici una dintre acestea nu este exclusiv asociată cu NK. Se pare că rolul important din acest punct de vedere ar reveni unei proteine de 80 kD cu funcție de receptor pentru liganzii de pe țintă. Este posibil ca efectele antitumorale *in vivo* să fie indirecte, celulele NK fiind activate de citokine imuno-reglatoare care

Fig.57. Funcțiile citotoxice ale celulelor NK din sângele unui pacient cu LLCT, consecutiv terapiei cu Cantastim (săgețile), evaluate *in vitro*. Celulele țintă folosite au fost din linia K562 marcate radioactiv cu <sup>51</sup>Cr. Activitatea citotoxică a fost exprimată ca procent de eliberare specifică a izotopului.



Eliberarea specifică a  $^{51}\text{Cr}$  din celulele țintă K562 sub acțiunea celulelor NK la diferiți subiecți, determinată la interval de 4-5 luni

Subiect nr.	Testarea nr.			Activitatea NK
	1	2	3	
1	2,50	3,42	2,31	Scăzută
2	6,30	0,00	4,30	"
3	14,40	8,08	9,80	"
4	16,40	12,60	11,60	"
5	50,00	30,00	54,00	Crescută
6	31,00	62,00	48,00	"
7	45,20	46,30	39,20	"
8	47,00	42,00	60,00	"
9	71,00	27,00	8,00	Variabilă
10	5,60	18,00	50,00	"
11	13,00	35,00	4,00	"
12	0,00	9,80	36,20	"

pot contribui nu numai la menținerea homeostaziei funcțiilor imune, dar și la distrugerea nespecifică, dar selectivă a celulelor tumorale.

### CELULELE K

Celulele care au receptori *Fc* pot liza țintele care au fixat pe suprafața lor molecule de anticorp, realizând citotoxicitatea mediată celular dependentă de anticorp sau ADCC (ADCC=antibody dependent cellular cytotoxicity). Prin receptorul *Fc*, celula efectoare fixează fragmentul *Fc* al moleculei de anticorp fixată prin *Fab* la suprafața celulei țintă, fixare care condiționează declanșarea mecanismelor ei litice.

Deci, în citotoxicitatea ADCC, celula efectoare ucide nespecific orice țintă care a fost recunoscută specific de către moleculele de anticorpi (fig. 58). Efectoarele acestei citotoxicități sunt denumite generic celule *K* ("killer"=ucigașe). Ar fi celule *NK*, monocite, promonocite sau chiar o linie aparte de celule, derivate din măduva

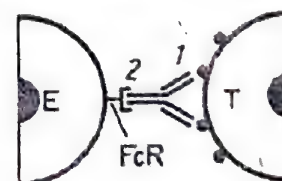


Fig.58. Mecanismul de acțiune a limfocitelor *K* în citotoxicitatea mediată celular anticorp-dependentă (ADCC). Celula ucigașă (*E*) se fixează la celula țintă (*T*) prin intermediul receptorului *FcR* pentru fragmentul *Fc* (2) al moleculei de anticorp (1) care s-a fixat specific pe antigenele de la suprafața țintei.



osoasă. Ele pot recunoaște ca țintă hematiile, fibroblastele, limfocitele normale sau deviate neoplazic etc. Pentru realizarea lizei, sunt suficiente cca. 100 de molecule IgG pentru o singură celulă țintă, excesul de anticorpi inhibând procesul litic. Acest fapt subliniază importanța citotoxicității ADCC în apărarea organismului. Intervine în momentele timpurii ale agresiunii când abia începe sinteza anticorpilor și comutarea de la IgM la IgG. O parte din celule se fixează specific pe țintă, iar celulele *K* la *Fc*, activându-și mecanismele litice.

Mai târziu, când titrul anticorpilor crește, această activitate este inhibată fiind înlocuită de alte mecanisme de apărare (citotoxicitate mediată de celulele *Tc*, de complement etc.).

Unii autori afirmă că celulele *K* și *NK* ar fi identice, argumentul principal adus în sprijinul acestei afirmații fiind existența pe ambele celule a receptorului *Fc*. Dar, experimentele pe purceii nou-născuți au demonstrat că populația *K* apare mai timpuriu decât cea *NK* și că au alt mod de distribuire în organe. La om, în unele deficite imune, funcțiile *NK* sunt inhibate sau chiar anulate, pe când cele *K* rămân neinfluențate. De asemenea, PHA, interferonii activează funcțiile *NK* dar nu ADCC, pe când pronaza, în anumite concentrații, inhibă *NK* dar nu ADCC. Toate acestea dovedesc că efectoarele acestor două modalități diferite de citotoxicitate, cel puțin din punct de vedere funcțional, reprezintă entități diferite.

Ca și citotoxicitatea *NK*, funcția ADCC este influențată negativ sau pozitiv de către diverși factori, ca de pildă de către fragmentele complementului, unele citostatice cum ar fi ciclofosfamida, clasa moleculelor de anticorp fixate pe țintă, numărul lor etc. În orice caz, această funcție este mai "robustă" decât altele, utilizarea ei ca test imunologic având o valoare diagnostică și prognostică modestă.

#### CELULELE LAK

*Celulele LAK* ("lymphokine activated killer" = ucigașe activate de limfokine) sunt efectori citotoxici activați de către IL-2 sau IFN  $\alpha$ . Limfocitele din sângele periferic, de exemplu, cultivate *in vitro* în prezența IL-2 și a antigenului tumoral, devin intens citotoxice față de tumorile respective. Unii autori susțin că progenitorii acestora sunt multipli, deci populația *LAK* ar fi formată din diferite linii celulare care însă formează un "sistem funcțional unic". Alții consideră că precursorii lor sunt unici și diferiți de precursorii celulelor *NK* sau ai limfocitelor *Tc*.

Există asemănări morfologice între *LAK* și *NK*, cel puțin o parte din efectele antitumorale mediate de *NK* fiind probabil realizate consecutiv producerii și eliberării de citokine, și în special de IL-2 care este un potent stimulator al lor. Dar, pentru a se putea stabili cu certitudine existența unor deosebiri între *NK* și *LAK*, ar trebui să se realizeze o depleție a celulelor *NK* prin liza selectivă cu anticorpi selectivi și să se determine apoi dacă celulele neafectate de anticorpii anti-*NK* mai pot sau nu acționa citolitic sub acțiunea IL-2.

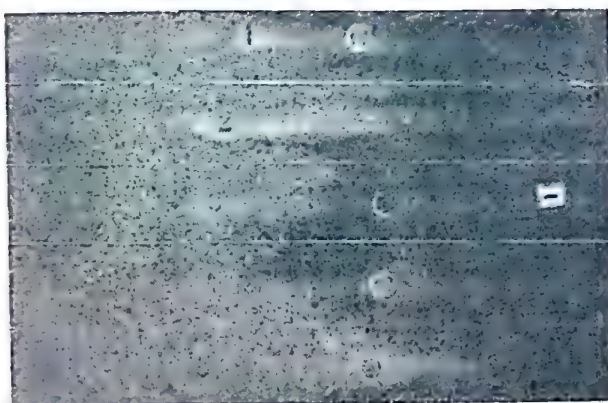
## • EFECTORII UMORALI AI IMUNITĂȚII

### IMUNOGLOBULINE: STRUCTURĂ ȘI FUNCȚII

#### DEFINIȚIE. NOȚIUNI GENERALE

Imunoglobulinele (Ig) sunt un grup de proteine înrudite, cu funcții de anticorp, care există sub formă de molecule libere sau de receptori de membrană pentru antigen de pe suprafața limfocitelor B, efectoare ale răspunsului imun mediat umoral. Ele migrează electroforetic, în mare parte în zona gammaglobulinelor și mai puțin în cea a betaglobulinelor (fig. 59, 60, 61). Sinteza lor este realizată de

Fig.59. Migrarea în câmp electric a globulinelor serice de șoarece. În cele 5 godeuri de pe placa acoperită cu gel de agar în tampon-veronal au fost introduse seruri recoltate de la embrioni de șoarece (1), pui nou-născuți (2), sugari de diferite vârste (3,4) și adulți (5). Spre anod (+) au migrat albumina,  $\alpha$ - și  $\beta$ -globulinele, iar spre catod (-) imunoglobulinele. Se observă absența acestora în serul embrionilor și al nou-născuților (1,2) și valorile lor reduse la sugari (3,4). La adult (5), prezența lor este evidentă.



către limfocitele B ajunse în faza de maturare finală (plasmocit). Se găsesc în plasmă, în lichidele extravasculare și în diferite secreții exocrine. O parte din molecule se fixează citofil pe receptorii pentru Fc de pe membrana macrofagelor, limfocitelor B, granulocitelor PMN, mastocitelor, bazofilelor etc.

Fig.60. Migrarea globulinelor serice de șoarece în câmp electric. Sus: ser de șoarece adult. Jos: ser de embrion. 1 = albumină; 2 =  $\alpha$ -globuline; 3 =  $\beta$ -globuline; 4-gammaglobuline (absente la embrion).

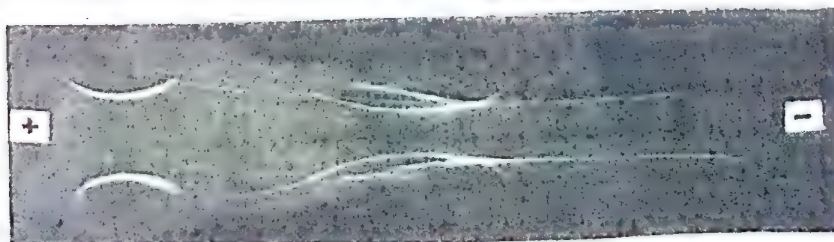
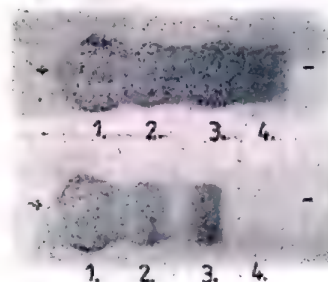


Fig.61. Linile de precipitare ale globulinelor serice umane, în imuno-electroforeza în gel de agar. Spre anod (+) sunt liniile date de albumină,  $\alpha$ - și  $\beta$ -globuline iar spre catod (-) cele ale imunoglobulinelor.



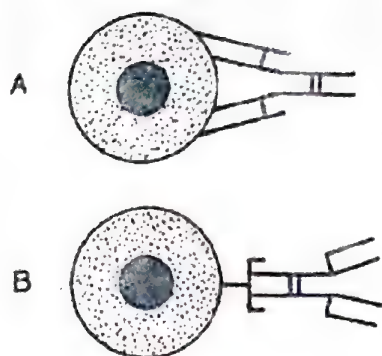


Fig. 62. Fixarea specifică (A) și citofilă (B) a unei molecule de imunoglobulină pe suprafața unei celule.

În organism pot exista ca: a) molecule libere, răspândite în plasmă și în alte lichide ale corpului; b) sub formă de complexe antigen + anticorp; c) molecule fixate citofil la diferite celule sau țesuturi (fixate prin fragmentul Fc de la extremitatea COOH a moleculei și nu specific, prin situsul combinativ de la extremitatea NH<sub>2</sub> terminală); d) molecule fixate în membrana plasmatică a limfocitelor B, cu rol de receptori pentru antigen (fig. 62).

În componența lor se găsește cea cca. 20 de aminoacizi esențiali care intră în alcătuirea cricării molecule de proteină, dar structura lor specifică este determinată de secvența aminoacizilor în lanțul polipeptidic primar. Ig se deosebesc de globulinele serice normale prin capacitatea de reacție specifică cu antigenul care le-a determinat sinteza, prin sensibilitatea la unele enzime de genul pepsinei și tripsinei, prin constanta de sedimentare, viscozitate etc. Moleculele de Ig fixează complementul, activează fagocitoza prin mecanisme așa-zise "opsonice" și pot străbate diferite bariere ale organismului. Ele au caractere antigenice proprii, împărțindu-se în clase, subclase și diferite alte subtipuri antigenice.

#### STRUCTURA IMUNOGLOBULINELOR

A fost descifrată datorită lucrărilor de pionierat ale lui R. PORTER și G. EDELMAN care au scindat prin proteoliză enzimatică molecula în lanțuri și în fragmente care au putut fi apoi studiate biochimic și funcțional (fig. 63).

R. PORTER (1959), prelucrând molecula prin tratament enzimatic cu papaină, obține trei fragmente, dintre care două legau antigenul, din care cauză au fost denumite fragmente Fab (Fragment antigen binding, sau fragment care leagă

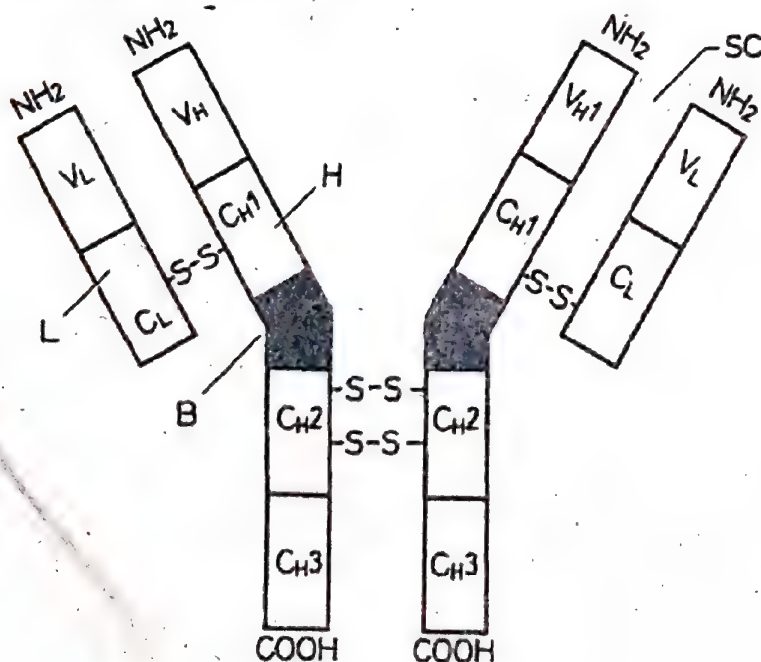
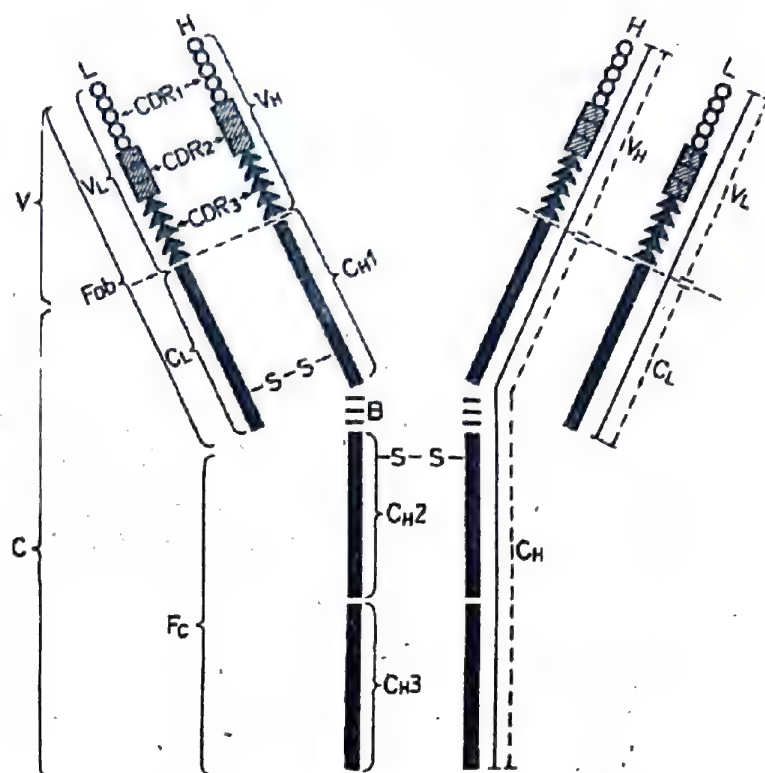


Fig. 63. Structura moleculei de imunoglobulină. Molecula este un dimer cu două lanțuri lungi (H) și două lanțuri scurte (L) legate între ele prin legături disulfidice (-S-S-). Poziția reziduurilor de aminoacizi în lanțurile lungi și scurte este variabilă spre extremitățile NH<sub>2</sub> terminale unde se formează domeniile variabile VL și VH. Către extremitățile COOH terminale, este tot mai constantă, formând domeniile CL și CH1, CH2 etc. Domeniile VL și VH alcătuiesc situsul combinativ (SC) la nivelul căruia este recunoscut și fixat specific epitopul. Între domeniile CH1 și CH2 este "regiunea balama" (B).

Fig.64. Papaina scindează moleculele de imunoglobulină la nivelul reziduurilor de His-Tr aflate înaintea dublelor legături -S-S- ale lanțurilor H, în două fragmente Fab formate din domeniile VL, VH, CL și CH<sup>1</sup> și un fragment Fc format din CH<sup>2</sup> și CH<sup>3</sup>.



antigenul) și unul care cristaliza, fiind denumit fragment Fc (fragment cristalizabil) (fig. 64). Fiecare fragment Fab are greutatea moleculară de cca. 45 kD, leagă antigenul monovalent cu care însă nu formează aglutinate sau precipitate vizibile. Fragmentul Fc are greutatea moleculară de cca. 55 kD, poate fixa complementul și se poate lega citofil la receptorii pentru Fc de pe membrana diferitelor celule.

Prin digestia cu pepsină, s-a obținut un fragment bivalent, adică cele două fragmente Fab unite între ele dar fără fragmentul Fc, din care cauză a fost denumit fragmentul F(ab')<sub>2</sub>. Are greutatea moleculară de cca. 100 kD și participă în calitate de anticorp complet la reacțiile de aglutinare și precipitare (fig. 65).

G. EDELMAN (1959), reducând prin 2-mercaptoetanol legăturile disulfidice ale moleculei, a izolat patru lanțuri polipeptidice. Molecula de Ig, în prezența 2-mercaptoetanolului dizolvat într-o soluție concentrată de uree, s-a desfăcut în părțile sale componente, respectiv în cele patru lanțuri, dintre care două mai grele, cu greutate moleculară de 50-60 kD denumite H (heavy = greu) și două mai ușoare, cu greutate moleculară de 20-25 kD denumite L, de la termenul englezesc light care înseamnă ușor. Singure, nici unul dintre aceste lanțuri polipeptidice nu poate lega antigenul, fiind necesară unirea lor două câte două, adică unirea unui lanț L cu un lanț H pentru a forma locul de unire cu antigenul. Deci, fiecare moleculă de Ig este formată din cel puțin o unitate monomerică de bază care conține patru

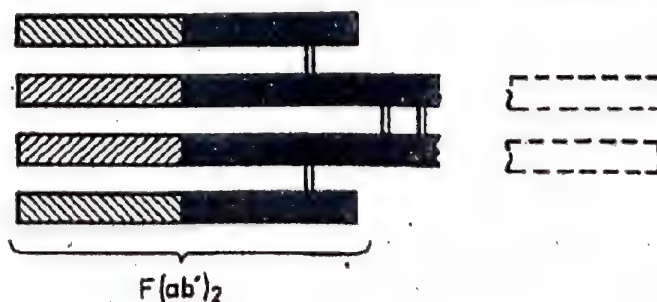


Fig.65. Pepsina scindează moleculele de imunoglobulină la nivelul reziduurilor de Leu aflate după dublele legături -S-S- ale lanțurilor H. Rezultă un fragment mare F(ab')<sub>2</sub>.



lanțuri polipeptidice: două *L* și două *H*, unite între ele prin punți disulfidice (-S-S-). Aceste punți se formează la nivelul reziduurilor de cisteină și pot fi în interiorul lanțului sau "intracatenar", și între lanțuri diferite sau "intercatenar". Ele sunt esențiale pentru asigurarea structurii tridimensionale a moleculei și pentru realizarea condițiilor de funcționalitate a ei.

Lanțurile *L* sunt comune pentru toate clasele de imunoglobuline, din punct de vedere antigenic putând aparține la două tipuri distincte: de tip  $\kappa$  (*kappa*) și de tip  $\lambda$  (*lambda*). În molecula de Ig ambele lanțuri aparțin în mod obligatoriu aceluiași tip, adică sunt  $\kappa$  sau  $\lambda$ . Aproximativ 60% dintre oameni au molecule de Ig cu lanțuri *L<sub>κ</sub>* dar această proporție poate varia în funcție de o serie de factori ca de pildă gradul de imunizare, antigenul imunizant, diferite stări patologice etc. La șoareci, moleculele cu lanțurile *L<sub>κ</sub>* reprezintă doar 5% din populația de Ig, predominante fiind cele cu lanțuri *L<sub>λ</sub>*.

Lanțurile *H* se deosebesc prin proprietățile lor antigenice, ele conferind caracterul de "clasă" imunoglobulinelor; lanțul greu al moleculelor IgM se numește  $\mu$  (*miu*), al celor IgG  $\gamma$  (*gamma*), IgA- $\alpha$  (*alfa*), IgE- $\epsilon$  (*epsilon*) și IgD- $\delta$  (*delta*). Analiza structurală și chimică a lanțurilor moleculei de Ig s-a realizat folosind populații moleculare foarte omogene, obținute de la pacienți cu mielom plasmocitar. În această stare patologică este o sinteză exagerată de molecule aparținând unei clase normale de Ig. Pot fi și situații în care sinteza exagerată să producă "molecule patologice" de imunoglobulină sau chiar numai lanțuri *L* sau *H*. Este cazul proteinelor Bence-Jones, niște dimeri de lanțuri *L<sub>κ</sub>* sau *L<sub>λ</sub>* sau al "lanțurilor grele patologice" în care lipsesc aminoacizii care formează segmentul C<sub>H1</sub>. Lanțurile *L* au cca. 214 reziduuri de aminoacizi și greutatea moleculară 25 kD, fiind compuse dintr-o regiune variabilă (*V<sub>L</sub>*) și una constantă (*C<sub>L</sub>*) care conțin fiecare cca. 107 reziduuri de aminoacizi. Din punct de vedere antigenic aparțin, după cum spuneam, tipurilor *L<sub>κ</sub>* sau *L<sub>λ</sub>*. Lanțul *L<sub>κ</sub>* are 214 aminoacizi, în secvența *V<sub>κ</sub>* fiind 107-108 reziduuri cu importante variații care permit împărțirea lui în trei grupe: *V<sub>κI</sub>*, *V<sub>κII</sub>* și *V<sub>κIII</sub>*. În regiunea *C<sub>κ</sub>* sunt numai variații alotipice, determinate genetic nu și variații somatice. La om, extremitatea COOH terminală are aminoacidul cisteină 214 care, în cazul lanțului *H* al moleculei de IgG1, leagă Cys 220, pe când în cel al IgG2 pe Cys 131, fapt care condiționează conformația sterică diferită a acestor două subclase de Ig. Lanțul *lambda* are 213-216 resturi de aminoacizi, cu cisteina situată în penultima poziție și nu ultima, cum este cazul la lanțul *L<sub>κ</sub>*. Extremitatea NH<sub>2</sub> terminată la *L<sub>λ</sub>* este blocată de acidul pirolidoncarboxilic, o anhidridă ciclică a acidului glutamic.

Variațiile în poziția aminoacizilor de la nivelul regiunii *V* permit împărțirea lor în 5 grupe antigenice diferite. De asemenea, în timp ce regiunea *C<sub>κ</sub>* este codificată de către o genă unică și prezintă o secvență aminoacidică unică, regiunea *C<sub>λ</sub>*, codificată de către trei gene diferite, prezintă trei secvențe: două se datoresc permutării lizină-arginină din poziția 190 (factorul Oz), iar a treia, permutării glicină-serină din poziția 154 (factorul Kern) (tabelul 37). Aceste secvențe există la toți indivizii, fiind deci "markeri izotipici". Niciodată nu se atașează o regiune *V<sub>κ</sub>* la una *C<sub>λ</sub>* sau invers, ci întotdeauna *V<sub>κ</sub>* se atașează la *C<sub>κ</sub>* și *V<sub>λ</sub>* la *C<sub>λ</sub>*. De altfel, întotdeauna *C<sub>κ</sub>* de la diferite specii de animale seamănă mai mult între ele, sunt mai omoloage decât *C<sub>κ</sub>* cu *C<sub>λ</sub>* provenite de aceeași specie.



Factorii OZ și KERN la nivelul lanțurilor L u nane

Caracterul	Cl1		Cl2		Cl3	
	Kern <sup>-</sup>	Oz <sup>-</sup>	Kern <sup>-</sup>	Oz <sup>+</sup>	Kern <sup>+</sup>	Oz <sup>-</sup>
Poziția aminoacidului în lanț	154	190	154	190	154	190
Aminoacidul implicat	Ser	Arg	Ser	Lys	Gly	Arg

Structura lanțurilor H diferă în secvența aminoacizilor în funcție de clasa de Ig căreia îi aparține molecula. Regiunea variabilă  $V_H$  are o mai mare variabilitate decât cea  $V_L$ , asigurând astfel un potențial sporit de recunoaștere a epitopilor. Regiunea constantă  $C_H$  conferă moleculei diverse caracteristici antigenice, deoarece această regiune poate determina lungimea lanțului și numărul de domenii, numărul și localizarea legăturilor disulfidice (inter- sau intracatenar), poziția și modul de așezare a oligozaharidelor care, la rândul lor, afectează conformația și cresc solubilitatea moleculei, gradul de polimerizare a ei etc. În general, cele mai multe legături oligozaharidice sunt de tip *N-glucozidic* interesând acidul aspartic, legarea făcându-se, cel puțin în cazul lanțurilor  $\mu$ , în secvența obligatorie Asp-oligozaharid-Ser-Thr.

Lanțurile H diferă între ele prin secvența aminoacidă specifică fiecărui lanț, care le conferă proprietăți antigenice diferite. Cu toate acestea, s-a observat că există un oarecare grad de omologie, în aceeași poziție existând, la lanțuri diferite, aceleași resturi de aminoacizi. Relația structurală devine mai evidentă când regiunile constante C sunt aliniate la reziduul Cys, care asigură legătura disulfidică intercatenară. Lanțurile H sunt de cca. două ori mai lungi decât cele L, conținând cca. 450-600 reziduuri de aminoacizi, regiunea lor constantă C fiind de 3-4 ori mai lungă decât  $C_L$ .  $C_H$  are 3-4 domenii alcătuite din câte 100-110 aminoacizi denumite  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  și eventual,  $C_{H4}$ . Imunoglobulinele claselor IgG, IgA și IgD au câte trei domenii, iar cele ale claselor IgM și IgE, câte patru domenii constante, lanțurile  $\mu$  și  $\epsilon$  fiind mai lungi decât cele  $\gamma$ ,  $\delta$  și  $\alpha$ . Pentru marcarea lor se folosesc următoarele simboluri:  $C\gamma 1$ ,  $C\gamma 2$ ,  $C\gamma 3$ , pentru IgG;  $C\mu 1$ ,  $C\mu 2$ ,  $C\mu 3$  și  $C\mu 4$  pentru IgM;  $C\alpha 1$ ,  $C\alpha 2$  și  $C\alpha 3$  pentru IgA;  $C\delta 1$ ,  $C\delta 2$  și  $C\delta 3$  pentru IgD;  $C\epsilon 1$ ,  $C\epsilon 2$ ,  $C\epsilon 3$  și  $C\epsilon 4$  pentru IgE.

Lanțurile H și L sunt legate prin legături disulfidice intercatenare (v. fig. 63), iar în ce privește pe cele intracatenare, lanțul L are două legături disulfidice, una la nivelul regiunii variabile V și alta la nivelul celei constante C. Fiecare legătură realizează o buclă care conține 60-70 de aminoacizi. Lanțurile H conțin mai multe legături disulfidice. De exemplu, lanțurile  $\gamma$  au patru legături, formând domenii: lanțul L are două domenii realizate la nivelul regiunilor V și C, iar lanțul H al IgG are patru domenii ( $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  și  $C_{H3}$ ), o moleculă de IgG conținând în total 12 domenii (fig. 66 A și 66 B).

Situsul combinativ (SC) situat la extremitatea  $NH_2$  terminală a fragmentului Fab, respectiv a moleculei de Ig, este locul prin care molecula recunoaște și leagă specific antigenul sau, altfel spus, este rațiunea funcțională a ei. Este alcătuit din ariile variabile și hipervariabile de pe  $V_H$  și  $V_L$ , fiind diferit ca formă, mărime etc.



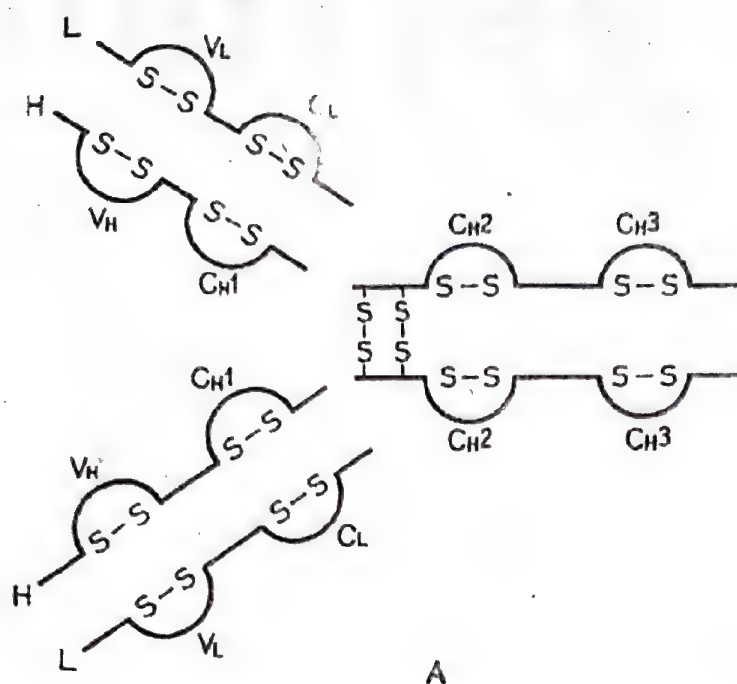


Fig.66A. Domeniile moleculei de imunoglobulină rezultate din stabilirea legăturilor -S-S- "intra lanț". Lanțul L are 2 domenii iar lanțul H are 4 sau 5 domenii.

O moleculă monomer de IgG are două SC, fiecare având o suprafață de cca.  $1000 \text{ \AA}^2$ , față de cca.  $70\,000 \text{ \AA}^2$  cât are întreaga moleculă (deci cca.  $1/70$ - $1/100$  din întreaga ei suprafață). Secvența aminoacidică a celor trei DR (regiuni de determinare a complementarității) de pe  $V_L$  uman sunt inserate între 4 segmente *Fr* (cadru) păstrate de-a lungul evoluției filogenetice. În "zonele cadru *Fr*" este prezent glicocolul, care pare să contribuie la asigurarea invariabilității lor. Prin "cudarea" lanțurilor *H* și *L*, zonele hipervariabile de pe *H* se apropie de cele de pe *L*, astfel încât formează o unitate funcțională, respectiv "situsul combinativ" (fig. 67 și 68). Pozițiile corespunzând CDR pot fi ocupate de fiecare din cei 20 de aminoacizi, numărul specificităților rezultate fiind destul de larg pentru a corespunde tuturor epitopilor existenți în natură. Dacă se iau în considerare și posibilitățile de diversificare date de zonele *Fr*, atunci se realizează la adevărată sa valoare uriașul potențial de variabilitate a situsului combinativ. Un SC poate astfel lega mai mulți epitopi înrudiți structural, legare care se realizează prin interacțiuni necovalente, un rol important revenind Lys și Tyr. În unele cazuri, se pot forma legături la nivelul unor locuri distincte între antigen și SC, fără asemănări structurale. Acest proces de "legare multispecifică" a diverse antigene total neînrudite sporește gradul de diversificare funcțională a potențialului de recunoaștere a moleculelor de anticorpi.

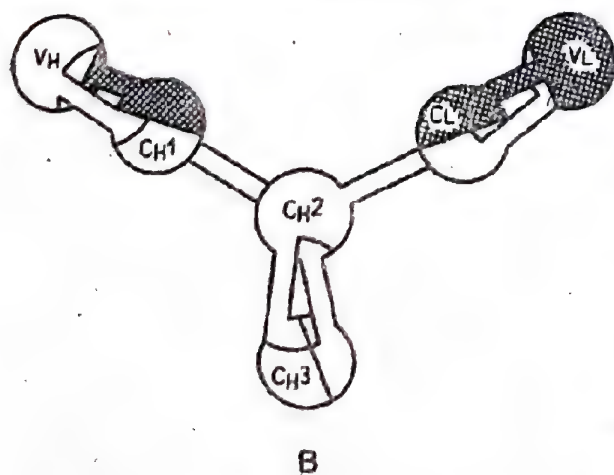


Fig.66B. Reprezentarea "stilizată" a domeniilor moleculei de IgG.

Detectarea aminoacizilor care alcătuiesc SC se realizează prin metode de afinitate, care constau din marcarea radioactivă cu  $^{14}\text{C}$  sau cu  $^3\text{H}$  a unei grupări reactive dintr-o haptena. Situsul combinativ fixează haptena, gruparea reactivă marcată se leagă la

unul sau mai mulți aminoacizi, după care fracțiunea peptidică din SC care a legat gruparea este izolată prin hidroliză chimică (tratare cu bromcianură-BrCN) și analizată. Așa s-a putut stabili că aminoacizii care fixează haptenele sunt în regiunea hipervariabilă a lanțurilor *H* și *L* și nu în regiunea *C* (fig. 69).

Regiunea "balama", alcătuită din 15 aminoacizi, este secvența care unește fragmentele de lanț *Fd* cu *Fc*, respectiv *CH1* cu *CH2* a lanțurilor grele. Deci, regiunea balama asigură conexiunea dintre *Fab* și *Fc*, fiind codificată de un exon separat al ADN. Are o structură primară unică, porțiunea ei centrală constând din două legături disulfidice legate la un helix de prolină, care conferă rigiditate lanțului polipeptidic, restrângându-i rotația. De fapt, piesa principală este octopeptidul ciclic, rigid, cu o suprafață de cca. 1 000 Å<sup>2</sup> și cu secvența:

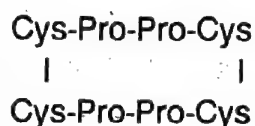


Fig.68. Reprezentarea schematică a "zonelor cadru" (Fr) și a celor de determinare a complementarității (CDR) de la nivelul extremităților NH<sub>2</sub>-terminale ale lanțurilor *H* și *L*, care formează partea "hipervariabilă" a situsului combinativ.

Punctul rigid acționează – ca un pivot al părții flexibile a regiunii balama – tripsina și papaina, clivând molecula de Ig înaintea pivotului. De altfel, susceptibilitatea la acțiunea enzimei proteolitice a balamalei este evidentă în cazul unor clase de molecule de Ig (IgG), dar nu și în cazul altor clase (IgA). De exemplu, o moleculă IgG în prezența tripsinei, la +60° C, clivează în *Fab* și *Fc*, pe când una

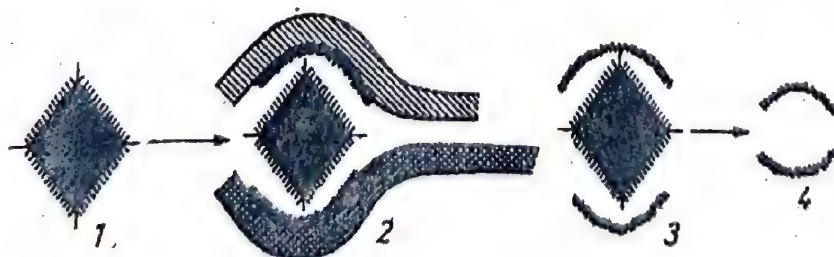


Fig.69. Modalitatea practică de identificare a reziduurilor de aminoacizi de la nivelul domeniilor *V<sub>L</sub>* și *V<sub>H</sub>*. Haptena marcată radioactiv (1) este recunoscută și fixată la situsul combinativ al moleculei (2), după care se izolează (3) și se identifică aminoacizii legați (4).



de IgA supusă aceluiași tratament nu clivează, probabil datorită marelui conținut de hidrați de carbon din interiorul și din apropierea acestei regiuni.

Regiunea balama joacă un rol important în funcționalitatea moleculei, ei revenindu-i o serie de atribute funcționale cum ar fi: a) la acest nivel se află legăturile disulfidice dintre lanțurile *H*; b) permite fragmentelor *Fab* să se orienteze în spațiu în diferite poziții; c) asigură unirea fragmentelor *Fab* și *Fc* cu funcții diferite, într-un complex molecular unic; d) pe la acest nivel se transmit de la SC al *Fab* la domeniile constante ale *Fc* efectele complexării moleculei cu antigenul.

Absența regiunii balama generează o asociere între *Fab* și  $CH_2$ , rezultând o moleculă rigidă, în formă de "T", cu funcții alterate. Această moleculă este incapabilă să mai lege  $C1q$ , să interacționeze cu receptorul pentru *Fc* de pe membrana limfocitelor *B* sau PMN, are o slabă activitate pentru receptorul *Fc* de pe macrofage, o redusă capacitate de a se lega la sincitiotrofoblastele placentare, dar își păstrează nealterată capacitatea de legare a proteinei A a stafilococului (*Spa*).

Toate acestea demonstrează că regiunea balama are un rol important în conservarea funcțiilor moleculei, permițând atât flexibilitatea ei, cât și transmiterea semnalelor de la SC la *Fc*.

#### FRAGMENTUL *Fab*

Fragmentul *Fab* situat spre extremitatea  $NH_2$  terminală, deci la nivelul *Fv*, este alcătuit din regiunile  $V_H + V_L$  și din domeniile  $CH_1 + CL$ . La nivelul regiunii *V*, aminoacizii sunt înșiruiți în secvențe cu diferite grade de variabilitate, dintre care unele sunt mai puțin variabile, iar altele sunt hipervariabile. Primele sunt denumite "regiuni cadru" sau *Fr* (de la "frame work" = cadru) și au rol în menținerea stabilității lanțului, iar celelalte, "regiuni de determinare a complementarității" sau CDR. O analiză a structurii tridimensionale indică existența unor constrângeri geometrice în multe regiuni ale moleculei, care restrâng posibilitatea variației lor în secvența aminoacizilor. O asocieră constantă a secvenței aminoacizilor în regiunile *V* ale lanțurilor este conferită de restul Gly care are un rol important în definirea și stabilizarea structurii. Aceasta, deoarece numai combinațiile specifice ale aminoacizilor sunt compatibile cu structuri ceva mai constant tridimensionale ale subunităților omoloage. De exemplu, secvența Phe-Gly-Gly-Gly din poziția 99-103 de pe  $V_L$  are echivalent secvența Trp-Gly-Gly-Gly din pozițiile 106-110 de pe  $V_H$ . Secvența lanțurilor *H* și *L* a arătat că regiunile hipervariabile a doua și a treia sunt mai lungi în  $V_H$  decât în  $V_L$ , în special la nivelul regiunii a treia, hipervariabilă care constă dintr-un număr variabil de aminoacizi (între 13 și 20 de reziduuri), pe când la  $V_L$  și  $V_H$  sunt doar 11-13 resturi de aminoacizi. Variația numărului de aminoacizi în cea de-a treia regiune hipervariabilă a diferitelor lanțuri *H* alterează lungimea buclei hipervariabile, schimbare care are un efect profund asupra lărgimii și adâncimii situsului combinativ și, de aici, asupra afinității și specificității moleculei de anticorp. Un rol similar modulator este dat de către variația în numărul de aminoacizi a primei regiuni hipervariabile *L*, precizată prin studii de cristalografie, difracții cu raze X, prin complexarea *Fab'* cu o haptenă etc.

Este alcătuit – la clasele IgG, IgA și IgD – din domeniile constante  $C_{H2}$  și  $C_{H3}$  unite prin legături disulfidice, iar la clasele IgM și IgE - din domeniile  $C_{H2}$  -  $C_{H4}$ . Prin digestie tripsică, respectiv prin expunerea moleculei de IgG la pH 2,5 regiunea dintre domeniile  $C_{H2}$  și  $C_{H3}$  devine tranzitoriu susceptibilă la clivajul cu plasmină sau tripsină, pentru ca la pH neutru să redevină rezistentă la aceste enzime. Prin alchilare și gel-filtrare se pot obține domeniile  $C_{H2}$  monomer, iar digestia cu pepsină sau papaină permite obținerea de  $pF_c$ , respectiv  $F_c'$ . Așa s-a demonstrat că domeniul  $C_{H2}$  și nu domeniul  $C_{H3}$  leagă complementul, că  $F_c$  este responsabil de rata catabolismului molecular etc. Se poate afirma că fragmentele  $Fab$  și  $F_c$  sunt sediul unei remarcabile dualități funcționale a moleculei de Ig, în sensul că  $Fab$  leagă specific antigenul, iar  $F_c$  conferă moleculei posibilitatea de a prezenta antigenul astfel fixat sistemelor celulare de neutralizare a lui (tabelul 38).

Tabelul 38

Unele funcții ale fragmentelor sau ale unor domenii ale moleculei de imunoglobulină (IgG)

Fragmentul sau domeniul	Funcția
$F_v (V_H + V_L)$	Leagă antigenul (formează situsul combinativ)
$C_{H1} + C_L$	Legături disulfidice care unesc lanțurile $H$ și $L$ Legături necovalente intercatenare Asigură legăturile dintre situsul combinativ și $F_c$ Leagă fragmentul $C_{4b}$ al complementului
Balama	La acest nivel sunt legături disulfidice inter-lanțuri $H$ Unește fragmentul $Fab$ cu fragmentul $F_c$ Permite poziționarea în spațiu a $Fab$ Transmite modificările la $F_c$ după legarea antigenului de $Fab$
$C_{H2}$	Leagă fragmentul $C_{1q}$ al complementului Controlează rata de catabolizare a moleculei
$C_{H3}$	Asigură legături necovalente între lanțuri Leagă molecula la receptorul pentru $F_c$ de pe monocite și macrofage
$C_{H2} + C_{H3}$	Leagă proteina A stafilococică Leagă molecula de Ig la receptorul pentru $F_c$ de pe celule $K$ , neutrofile, celulele sincitiotrofoblastice Realizează transferul transplacental

Principalele proprietăți funcționale ale moleculei de Ig mediate de către fragmentul  $F_c$  sunt următoarele:

– Interacționează cu proteinele complementului, situsul de legare a componentei  $C_{1q}$  fiind la nivelul domeniului  $C_{H2}$  al moleculei de IgG. De altfel, sunt două situsuri distincte de legare a  $C_{1q}$ , câte unul pentru fiecare monomer și care



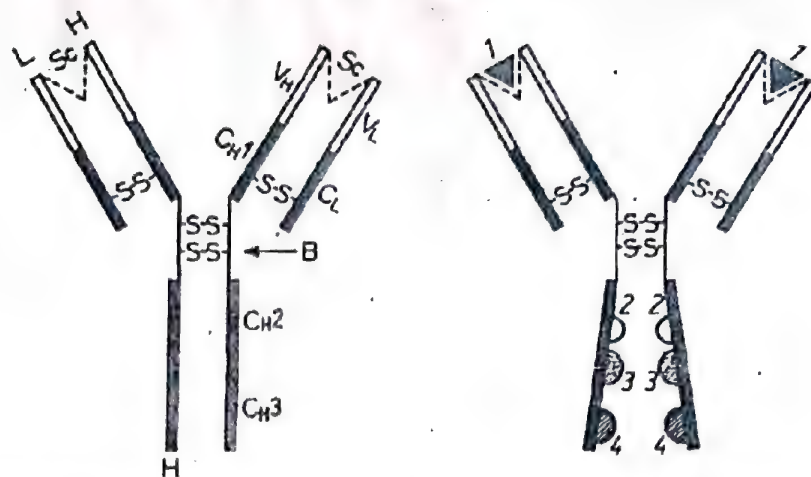


Fig.70. Locuri de legare sau de activare de la nivelul moleculei de imunoglobulină.

1 = situsul combinativ (de legare a antigenului); 2 = situsul de legare a complementului (C1q); 3 = situsul de legare a proteinei A stafilococice (SpA); 4 = situsul de legare la receptori pentru fragmentul Fc (FcR); B = regiunea "balama"; SC = situs combinativ (1).

funcționează independent (fig. 70). Se pare că din punct de vedere funcțional acest situs este mai dependent de conformația moleculei decât de structura ei. Interacțiunea cu factorii reumatoizi se realizează la nivelul domeniului CH2, molecula de IgG de la reumatici diferind conformațional de cea a indivizilor sănătoși.

– Interacționează cu proteina A stafilococică (SpA), o moleculă alfa-helicoidală cu greutatea moleculară de cca. 43 kD, lipsită de Cys și alcătuită din cinci regiuni (ABCDX) a câte 60 de reziduuri de aminoacizi, fiecare cu greutatea moleculară de cca. 7 kD. Regiunile au câte un situs activ care reacționează cu Fc al moleculei de IgG la mamifere, dar nu și de pasăre, situsul de legare interesând două segmente din domeniul CH2 și unul din CH3. Mai au un situs adițional și pentru Fab, situat pe CH1, care ar facilita legarea SpA la alte clase de Ig (IgA, IgE, IgM) în afară de clasa IgG.

– Interacțiunea SpA cu IgG liber sau sub formă de receptori de membrană și-a găsit o largă aplicare practică: obținerea de anticorpi hibridi legați prin SpA, folosirea SpA în plasmafereză ca mijloc de epurare a moleculelor de IgG care au legat antigene tumorale, sau a celulelor cu receptori imunoglobulinici (cromatografie de afinitate cu SpA + Sepharoză), studiul efectelor induse de către antigen asupra moleculei de anticorp etc. De exemplu, după legarea moleculei de antigen la Fc al IgG, se instalează o "dezordine" la nivelul domeniului CH2 care-și modifică componența glucidică, molecula de IgG devenind capabilă să lege ConA, pe care în mod obișnuit nu o leagă (această capacitate o are numai molecula de IgM). Anticorpul IgG de pasăre, care în mod normal nu leagă SpA, după ce au fixat antigenul, devin capabili să lege SpA. Molecula de SpA legată la o moleculă de IgG liberă favorizează fixarea C1q a complementului, în timp ce legarea SpA la o moleculă de IgG care a fixat antigenul inhibă legarea C1q. Fragmentul Fc asigură interacțiunea moleculei de Ig cu receptori pentru Fc (FcR) de pe membrana macrofagelor, limfocitelor B, K, T, NK etc. Responsabil de această funcție este domeniul CH3 al Fc. De exemplu, inhibiția rozetelor EA formate de eritrocitele de bovine care au fixat prin Fab anticorpii și celulele care au FcR este posibilă numai atunci când celulele cu FcR sunt în prealabil incubate cu molecula întreagă de Ig sau cu domeniul CH3, dar nu atunci când sunt incubate cu domeniile Fab sau CH2.

– Transportul transplacentar al Ig este posibil datorită legării moleculei prin *Fc* la membrana celulelor placentei, procesul fiind dependent de pH.

– Reglarea catabolismului moleculei este condiționată de prezența *Fc*. Moleculele diferitelor clase și subclase de imunoglobuline au o perioadă de înjumătățire diferită, locul responsabil pentru controlul metabolismului lor fiind la nivelul domeniului  $CH_2$  al *Fc*. Inoculat separat *in vivo*,  $CH_2$  are o durată de viață similară cu cea a *Fc* sau a moleculei de Ig, pe când  $CH_3$  și *Fab*, sunt distruse într-un timp mult mai scurt. Deci, situsul de reglare a catabolismului molecular de Ig este la nivelul domeniului  $CH_2$  al *Fc* (tabelul 39).

Tabelul 39

Perioade de înjumătățire a moleculei IgG murine și a diferitelor fragmente ale ei (valori medii + deviația standard a mediei)

Proteina	Timp de înjumătățire (T <sub>1/2</sub> )
IgG	74,0 ± 6,9
<i>Fc</i>	70,0 ± 7,7
$CH_2$	61,5 ± 7,8
$CH_3$	15,6 ± 0,9
<i>Fab</i>	17,1 ± 1,0

#### ETEROGENITATEA IMUNOGLOBULINELOR

Imunoglobulinele sunt eterogene din punct de vedere al încărcăturii electrice (migreză între zonele *alfa* și *gamma*), al specificității lor de anticorp, din punct de vedere antigenic etc. Această enormă diversitate a lor este generată de secvența aminoacizilor de la nivelul diferitelor fragmente, și anume: la nivelul *Fc* sunt generate diferențe antigenice pe baza cărora Ig se împart în diferite clase și specificități, realizându-se așa-zisele "specificități izotipice"; la nivelul *Fab*, care este sediul unde se leagă antigenele și unde se formează specificități idiotipice, iar la nivelul modului  $CH_1 + CL$  și al domeniului  $CH_2$  se pot realiza specificități antigenice proprii numai unor grupe de indivizi din cadrul aceleiași specii, respectiv "specificitățile alotipice". Prin "specificitate izotipică" se înțelege caracterul antigenic al moleculelor de imunoglobulină caracteristic tuturor indivizilor unei specii, ale căror forme polimorfe nu sunt controlate de legi mendeleene. Pe baza acestei specificități, în cadrul aceleiași specii sunt mai multe clase și subclase de molecule de Ig, care diferă sub raportul proprietății lor antigenice și funcționale. La mamifere se cunosc 5 clase de imunoglobuline, în cadrul cărora pot exista mai multe subclase. Astfel, IgG are 4 subclase care se deosebesc prin secvența aminoacizilor la nivelul lanțurilor *H* și prin numărul legăturilor disulfidice: subclasele IgG1 și IgG4 au câte 4 legături (punți) între lanțuri. Subclasa IgG2 are șase punți disulfidice intercatenare. Lanțurile *H* ale subclaselor IgG1 și IgG2, IgG3 și IgG4 sunt notate  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  și  $\gamma 4$ . Cele două subclase IgA se deosebesc între ele prin modul de legare a lanțurilor *L* și *H*. La variantele izotipice contribuie și frecvența răspândirii lanțurilor ușoare  $\kappa$  și  $\lambda$  la oameni. Majoritatea lanțurilor  $\lambda$  încep



la extremitatea N-terminală cu o grupare aminică blocată (acidul pirolidon-carbonic), în timp ce lanțurile  $\kappa$  au la extremitatea  $\text{NH}_2$  terminală, acidul glutamic sau asparagina. Pentru lanțurile  $\lambda$  sunt de asemenea cunoscute trei subtipuri. Astfel, diferențele izotipice sunt determinate de către secvența aminoacizilor în regiunea constantă a lanțurilor  $H$ , de numărul și poziția punților disulfidice etc.

Deci, **specificitățile izotipice** definesc caracterele antigenice ale moleculelor de imunoglobuline specifice indivizilor aparținând unei specii, cele **alotipice** – caracterele antigenice specifice unor grupuri de indivizi din cadrul unei specii, iar cele **idiotipice** – caracterele antigenice ale moleculelor de imunoglobuline care recunosc un anumit determinant antigenic din cadrul populației de molecule de imunoglobuline aparținând aceluiași individ (tabelul 40).

Tabelul 40

Principalele caracteristici ale specificităților izotipice, alotipice și idiotipice

Specificitatea	Modul de exprimare	Specificitatea antigenică situată pe	Implicarea legilor lui Mendel în transmitere	Specificitatea este recunoscută ca non proprie de către
Izotipică	Clase și subclase de Ig (IgG, IgA etc.)	Toată lungimea regiunilor $C_H$ și $C_L$	Nu	Toți indivizii unei alte specii, dar nu și de către cei ai speciei de la care provin moleculele
Alotipică	Sisteme alotipice (Gm, InV, Am, IsF etc.)	În anumite poziții din regiunile $C_H$ și $C_L$	Da	Numai unii indivizi aparținând aceleiași specii cu cei de la care provin moleculele
Idiotipică	O enormă varietate de specificități idiotipice	Regiunile hipervariabile $V_H$ și $V_L$	Nu	Același individ care a produs anticorpul

În cadrul specificităților izotipice, condiționat de caracterul antigenic al moleculelor de imunoglobuline, se cunosc clase și subclase cu proprietăți funcționale particulare (tabelul 41).

**Clasa IgG.** Sunt imunoglobulinele cele mai bine cunoscute, care reprezintă cca. 75% din totalul Ig din serul uman normal. Datorită faptului că este ușor de obținut în stare pură, această clasă a fost cel mai intens studiată atât biochimic cât și funcțional. Au constanta de sedimentare 7 S și greutatea moleculară de cca. 150 kD. Moleculele sunt termorezistente, nefiind denaturate în 30 de minute la  $+75^\circ\text{C}$ .

Moleculele IgG apar după stimulul antigenic secundar și sunt principalii anticorpi cu rol în neutralizarea toxinelor, virusurilor, bacteriilor, în fagocitoza opsonică, citotoxicitatea anticorp-dependentă etc. Aceste molecule activează complementul (cu excepția subclasei IgG4), se fixează la piele (cu excepția subclasei IgG2) și pot traversa placentă.

Tabelul 41

## Proprietățile biologice și fizico-chimice ale diferitelor clase de imunoglobuline umane

Proprietatea	Clasa de imunoglobuline				
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Lanțul greu este de tip	$\gamma$	$\alpha$	$\mu$	$\delta$	$\epsilon$
Formula moleculară este	$\gamma_2 k_2$ sau $\gamma_2 \lambda_2$	$\alpha_2 k_2$ $\alpha_2 \lambda_2$ și $(\alpha_2 k_2)_2 + J + PS$ sau $(\alpha_2 \lambda_2)_2 + J + PS$	$(\mu_2 k_2)_{5+J}$ sau $(\mu_2 \lambda_2)_{5+J}$	$\delta_2 k_2$ sau $\delta_2 \lambda_2$	$\epsilon_2 k_2$ sau $\epsilon_2 \lambda_2$
Concentrația în ser (mg/ml)	8 - 12	1,4 - 4,0	0,5 - 1,9	0,03 - 0,4	0,0001
Greutatea moleculară (kD)	150 - 160	170 în ser, 400 în secreții	900	185	190
Concentrația extravasculară (%)	60	60	20	25	50
Coeficient de sedimentare S	7	7; 9; 11	19	7	8
Greutatea lanțului H (kD)	53	56	65	69	72
Nr. domeniilor lanțului H	3	3	4	3	4
Hidrați de carbon (%)	2 - 5	8 - 10	10 - 12	12 - 15	11 - 12
Numărul subclaselor	4	2	-	-	-
Numărul situsurilor combinate	2	2; 4; 6	2 sau 10	2	2
Prezența lanțurilor de unire J	-	+	+	-	-
Rezistența la +56°C	+	+	+	-	-
Rezistența la 2-mercapto-etanol	++	±	-	++	-
Determinante izotipice (subclase)	1; 2; 3; 4	1; 2	-	-	-
Determinante alotipice: Gm(H)	+	-	-	-	-
InV (L)	+	+	+	-	-
Am	-	+	-	-	-
Sinteza (mg/kg/zi)	30	8 - 27	6 - 8	0,4	?
Catabolism (%/zi)	3	12	14	?	2,5
Perioada de înjumătățire (zile)	21 (la IgG <sub>3</sub> =7)	7	5,1	2,8	2,3
Capacitatea de fixare a complementului (cale clasică)	+ (IgG <sub>4</sub> nu)	- *	++	-	-



Proprietatea	Clasa de imunoglobuline				
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Pasajul transplacentar	+	-	-	-	-
Legarea la receptorul Fc de pe:	+	-	-	-	-
- macrofage					
- mastocite	-	-	-	-	+
- limfocite	+	+	+	?	-
Legarea SpA (proteinei A)	+	-	-	-	-

\* IgA activează complementul pe cale alternativă

Prin purificarea Ig provenite de la bolnavi cu mielom și cu ajutorul serurilor imune obținute față de aceste proteine-mielom, s-a constatat în interiorul acestei clase majore IgG existența a patru grupe distincte de molecule, care formează patru subclase IgG (tabelul 42) existente la toți indivizii (deci sunt izotip). Dozarea exactă a concentrației lor în ser a putut fi realizată numai după ce s-au pus la punct metodologia de investigare care utiliza anticorpii monoclonali și tehnicile imuno-enzimatice. Așa s-a putut preciza că, de multe ori, dozarea cantitativă a IgG totale este irelevantă, deoarece în unele afecțiuni sunt modificări la nivelul IgG2 sau IgG4, cum ar fi de exemplu infecțiile severe ale căilor respiratorii, fără ca valoarea globală a IgG să fie modificată. Subclasele diferă între ele prin numărul legăturilor disulfidice între lanțurile H, prin poziția acestor legături între H și L, prin sensibilitatea la proteoliza enzimatică, prin markerii alotipici și prin proprietățile lor biologice (fig. 71).

Tabelul 42

Unele caracteristici și proprietăți ale subclaselor de IgG

Caracterul, proprietatea	Subclase			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Procent din totalul de molecule IgG	66	23	7	4
Lanțul greu	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$
Fixarea complementului	+	+	+	-
Transfer prin placenta	+	+	+	+
Legarea proteinei A	+	+	-	+
Sensibilizarea pielii de cobai	+	-	+	+
Numărul dublelor legături disulfidice	2	4	15	2
Timp de înjumătățire (zile)	23	23	8	23
Fixarea la receptorii Fc de pe:				
macrofage	+	-	+	-
celule K	+	-	+	-
granulocite PMN	+	+	+	+
sincitiotrofoblast	+	+	+	+

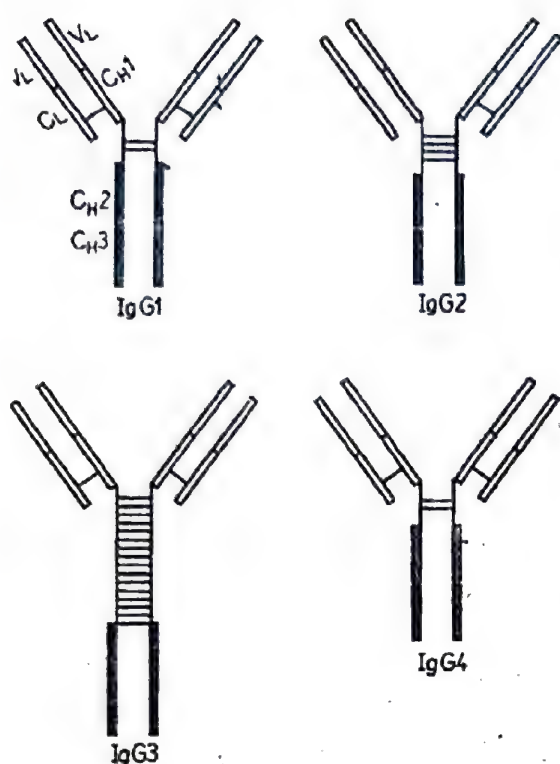


Fig.71. Legăturile disulfidice (-S-S-) la subclasele de IgG. Subclasele IgG1 și IgG4 au câte două legături -S-S- între lanțurile H, subclasa IgG2 are 4 legături, iar lanțurile H ale subclasei IgG3 sunt legate prin 15 legături -S-S-.

legături disulfidice, și are 10 situsuri identice de combinare cu antigenul dintre care sunt active numai cinci. Formele monomer se găsesc în ser în concentrații foarte mici, care însă cresc într-o serie de boli cum ar fi lupusul eritematos sistemic, ataxia-telangiectazia, macroglobulinemia Waldenström etc. În afară de lanțurile  $\mu$  și L, molecula IgM are un al treilea lanț, care unește "mănunchiul" de monomeri, din care cauză a fost denumit lanț J, sau "lanț de unire" (de la "joining chain"). Lanțul J lipsește la formele monomer fiind prezent numai la pentamer (fig. 72).

Lanțul greu al acestei molecule are cinci domenii, unul variabil (V) și patru constante (C). Molecula pentamer are formă de "stea", care se modifică în funcție de relația ei cu antigenul, putând lua formă de "masă rotundă" atunci când reacționează cu un număr mic de molecule de antigen, sau de "păianjen" atunci când reacționează cu numeroase molecule de antigen.

Moleculele IgM au o mare capacitate de aglutinare, precipitare sau de liză și, în special, au o mare capacitate de activare a complementului, capacitate care depășește de cca. 100 de ori pe cea a moleculelor IgG. Activarea complementului de către IgG se poate realiza numai în condiția existenței a două molecule foarte apropiate care să lege prin fragmentele lor Fc componenta C1q, condiție obligatorie pentru declanșarea cascadei activatoare. În cazul IgM, dat fiind că molecula este pentamer și are cinci fragmente Fc legate împreună prin lanțul J, este suficientă o singură moleculă pentru activare, deoarece se realizează condiția obligatorie, și anume legarea C1q la două fragmente Fc. Situsul de activare a complementului este situat la nivelul domeniilor C $\mu$ 3 - C $\mu$ 4 și devine accesibil în urma schimbărilor de conformație a moleculei după ce aceasta a fixat antigenul. Se pare că lanțul J nu are nici un rol în fixarea complementului, deoarece

Moleculele de anticorp din clasa IgG, care apar în cursul stimulului secundar sau prin comutare după stimulul primar, inhibă sinteza anticorpilor din clasa IgM printr-un proces de "reglare inversă" (sau "feedback" în terminologie anglo-saxonă), competiționând cu antigenele. Sinteza moleculelor de IgG aparținând diferitelor subclase este condiționată de natura stimulului antigenic: de exemplu, dextranul stimulează sinteza moleculelor din subclasa IgG2, cofactorul VIII a celor din subclasa IgG4 etc. Polenul activează sinteza anticorpilor IgG4, antigenele D (Rh) a celor IgG1 și IgG3, iar toxinele tetanice și difterice, a celor IgG1.

**Clasa IgM.** Moleculele IgM au greutatea moleculară cea mai mare (950 - 1000 kD). Reprezintă cca. 5-10% din totalul imunoglobulinelor și constituie anticorpii de răspuns primar, care apar după primul contact cu antigenul. Ca și celelalte Ig, se găsesc sub formă de molecule libere în circulație, pentamerii ( $\mu_2 L_2$ )<sub>5</sub> și sub formă fixă, de receptori pentru antigen pe membrana limfocitelor B. Pentamerul este alcătuit din cinci unități identice, legate între ele prin



monomerii desprinși din pentameri pot lega și activa complementul la aceeași intensitate, dacă se respectă dezideratul major, adică existența a două fragmente *Fc* apropiate. În dezvoltarea ontogenică apare pentru prima dată clasa de imunoglobuline IgM. De aceea, în serul nou-născutului imunoglobulina dominantă aparține acestei clase. Dar, chiar și la această vârstă fragedă, un nivel prea mare de anticorpi IgM sugerează existența unor infecții care de regulă recunosc ca agenți etiologici virusul rujeolos, virusul citomegalic, toxoplasma, *Spirocheta pallidum* etc. Această clasă de molecule este responsabilă de activitatea bactericidă a serului, cu referire specială la apărarea imună mediată celular față de salmonelle, la răspunsul imun față de fragmentul *Fc* al IgG în boala reumatismală (factorul reumatoid) etc.

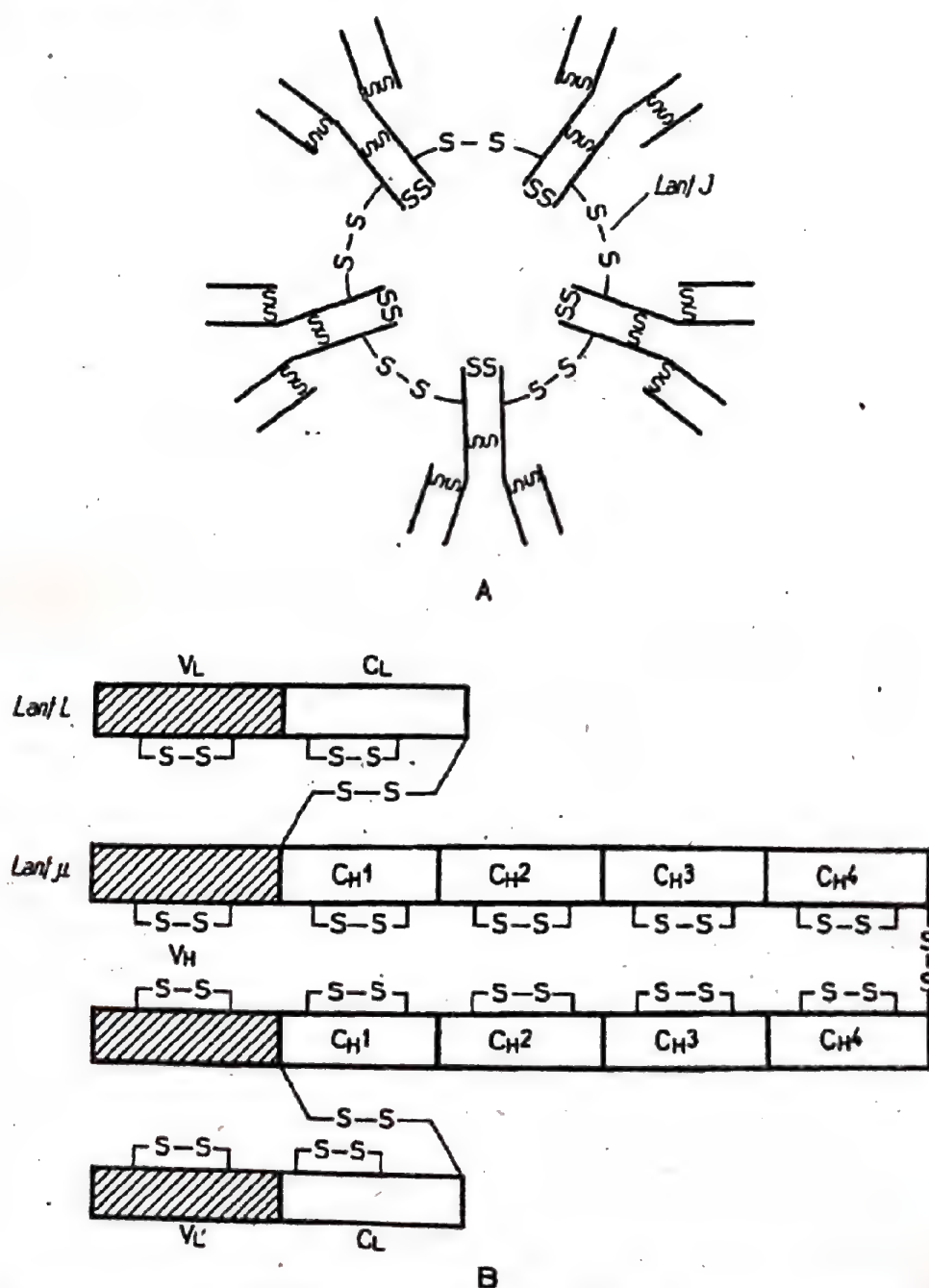


Fig.72. Molecula de IgM pentamer (A) și monomer (B). Molecula pentamer este alcătuită din 5 monomeri, legați între ei printr-un "lanț de legare" sau J. Fiecare monomer are câte 4 domenii constante (Ch) cu legături -S-S- între lanțurile grele.

Spre deosebire de alte clase de imunoglobuline, sinteza ei este mai puțin influențată de acțiunea unor factori imunodepresori, deși în sindroame de malabsorbție și în infecții cronice se înregistrează o scădere a concentrației IgM seric. Crește concentrația în artrite reumatoide și în hepatite. În cursul macroglobulinemiei Waldenström, creșterea considerabilă a IgM monoclonal în ser și tendința de a forma polimeri duc la instalarea unui "sindrom de hiperviscozitate" care de multe ori poate fi fatal pentru pacient, din care cauză se impun adesea intervenții rapide prin plasmafereze abundente.

Datorită volumului mare al acestei molecule, denumirea inițială a IgM pentamer a fost de beta<sub>2</sub>-macroglobulină.

Clasa IgA este alcătuită din două sisteme de imunoglobulină, și anume din IgA seric și IgA secretoriu, cu alcătuirii moleculare distincte.

IgA serică este prezentă în concentrație relativ mare, de cca. 2 g / l reprezentând cca. 15-20% din totalul imunoglobulinelor aflate în circulație. Deși se găsește din abundență în ser, totuși încă nu se cunosc anticorpii care să recunoască specific unii determinanți antigenici și care să aparțină acestei clase de imunoglobuline. Molecula, de regulă, este sub formă de monomer cu un coeficient de sedimentare 7 S și greutatea moleculară de 160 kD, alcătuită după același model ca și dimerul "clasic" IgG cu două lanțuri  $\alpha$  și două lanțuri L de tip k sau  $\lambda$ , cu dominația celor k. Se găsesc, mai ales în cazuri de mielom, dimeri sau chiar polimeri IgA care, pe lângă cele două lanțuri, mai au al treilea lanț, lanțul de unire J.

Se cunosc două subclase de IgA, și anume IgA1 care se găsește în proporție de 80% în ser și care are lanțul  $\alpha$  mai scurt cu cca. 40 reziduuri de aminoacizi și IgA2 cu o structură originală, în sensul că lanțurile L nu sunt unite la cele  $\alpha$  prin legături disulfidice, ci prin forțe covalente (fig. 73). Din această cauză, lanțurile  $\alpha$ 2 se pot disocia de lanțurile L numai în prezența ureei sau guanidinei, fără a mai fi necesară prezența reductorilor. Clasa IgA este mai bogată în hidrați de carbon decât clasa IgG, aceștia legându-se în special la regiunea balamalei.

IgA secretorie este principala imunoglobulină existentă în secrețiile salivare, nazale, bronșice, gastrointestinale și mamare, fiind secretată de către plasmocitele prezente în "lamina propria". Structura sa diferă de structura IgA seric, fiind un dimer cu constanta de sedimentare 11S și greutatea moleculară 400 kD, format din doi monomeri 7 S legați prin lanțul J. Dimerul mai conține o proteină suplimentară denumită "piesa secretorie" sau "piesa S" care nu are nici o relație structurală sau genetică cu molecula IgA, fiind sintetizată de către celulele epiteliale și nu de către plasmocite (fig. 74). Piesa S servește ca ligand al dimerilor IgA pentru suprafața celulelor epiteliale, ajutând la traversarea acestora de către dimer și la conferirea unei rezistențe particulare față de acțiunea enzimatică, activată la aceste nivele. Aproximativ 60% din moleculele IgA din secrețiile externe sunt dimeri, cca. 40% sunt polimeri și un număr extrem de mic există sub formă de monomeri.

Pentru ca aceste molecule să ajungă în secrețiile de pe suprafața mucoaselor, ele nu trec printre celulele epitelului ci prin citoplasma acestora. Această "trans-

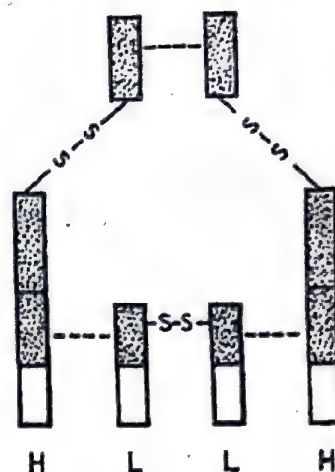


Fig.73. Subclasa IgA2. Este singura moleculă de imunoglobulină la care lanțurile L sunt situate în interior, fiind legate între ele prin legături-S-S-. De lanțurile H, lanțurile ușoare sunt legate prin legături necovalente (---).



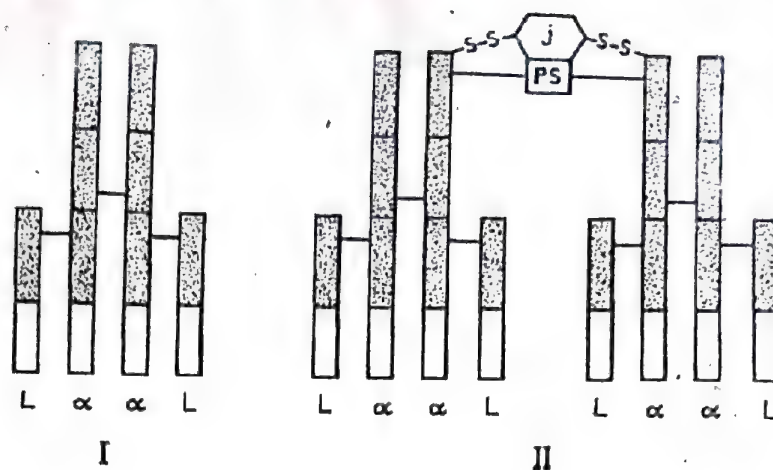


Fig.74. Moleculele de IgA monomer (I) și dimer (II).

PS = piesa secretorie; J = lanț de unire care leagă lanțurile  $\alpha$  prin legături -S-S-.

citoză epitelială" este mediată de către un receptor imunoglobulinic polimeric care are în componența sa și piesa secretorie (fig. 75). Molecula IgA se leagă la receptorul polimeric, după care este endocitată și transportată împreună cu acesta spre cealaltă extremitate a celulei. Aici are loc clivajul proteolitic, urmat de eliberarea IgA la care rămâne atașată acea parte a receptorului polimeric care este "componenta secretorie".

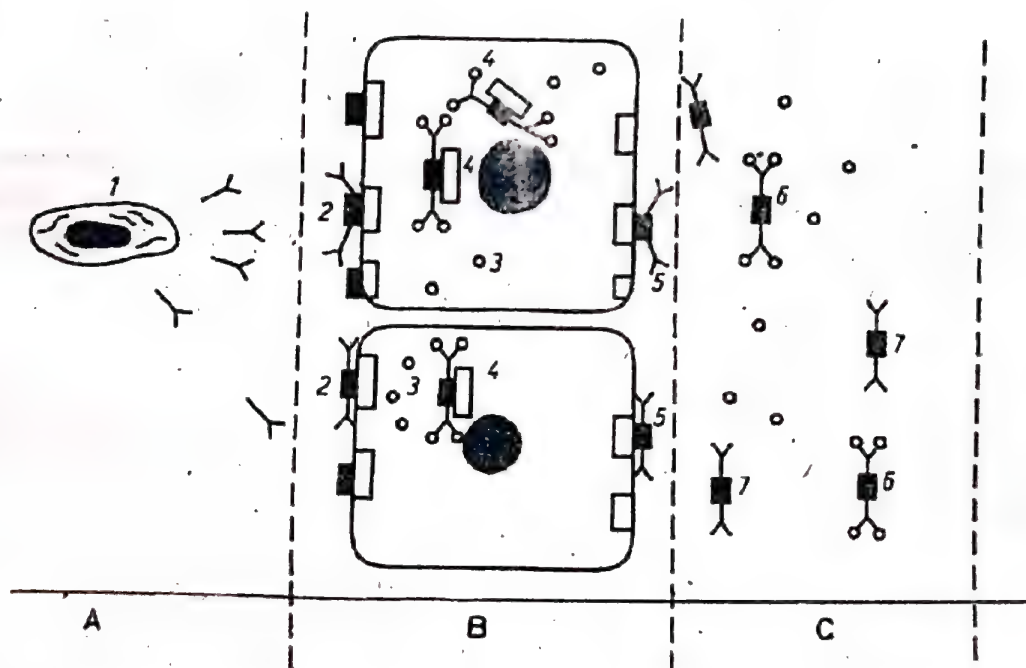


Fig.75. Traversarea epitelului intestinal de către moleculele de IgA secretorii. Sintetizate de către plasmocitele aflate în "lamina propria" (1), moleculele se fixează la "receptorul polimeric" de la nivelul peretelui celular (2). Împreună cu acesta, pătrund în citoplasmă unde neutralizează eventualele microorganisme ajunse aici (3,4). Traversează celulele părăsindu-le pe la polul opus (4), ajungând pe suprafața epitelului intestinal, având o parte din "receptorul polimeric" care este de fapt "piesa secretorie" (5). În lumenul intestinului, IgA neutralizează bacteriile blocându-le posibilitatea de aderență la celule (6). În acest mod, moleculele de IgA (7) protejează organismul de agresiunea microorganismelor aflate atât intracelular cât și extracelular (adaptare după M.B. Mazanec și col.).

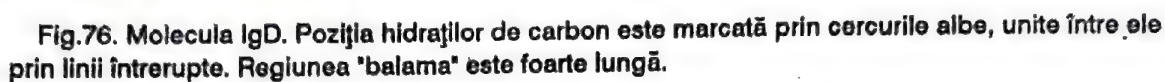
În diferite secreții ale organismului uman, IgA se găsește în concentrații diferite. Astfel, în salivă sunt 28 mg%, în colostru 151 mg%, în secrețiile oculare 7 mg%. În cele bronșice 10-70 mg%, în intestinul subțire 75 mg%, în vezica biliară 50 mg%, în prostată 25%. Concentrația cea mai redusă este în secrețiile vaginale (6 mg%). Spre deosebire de aceste secreții unde predomină IgA, în altele, ca de pildă lichidul sinovial, lichidul amniotic, pleural, cefalorahidian etc., predomină moleculele de IgG, raportul IgG/IgA fiind în jurul valorii de 5/1. Anticorpul din clasa IgA nu pot aglutina, precipita sau liza antigenele corpusculare, dar pot activa complementul pe cale alternativă (nu clasică). Cu toate acestea, IgA secretor are o capacitate bactericidă mare, fiind de opt ori mai activă față de *E. coli* decât moleculele IgM și de 25 de ori decât cele IgG. De asemenea, joacă un mare rol în apărarea locală antivirală. Mecanismul de acțiune al acestei clase de Ig nu este încă suficient cunoscut. Se presupune că aceste imunoglobuline ar împiedica penetrarea bacteriilor în celulele epiteliale ale mucoaselor inhibând fixarea microbilor pe suprafața acestora.

Se pare că IgA ar acționa la trei niveluri, și anume: a) la nivel extern, pe suprafața mucoaselor lumenului intestinal unde-și exercită efectul lor bactericid; b) intracelular, adică intracitoplasmatic, unde în cursul transcitozei neutralizează germenii cantonați aici datorită parazitismului lor intracelular obligatoriu și c) în "lamina propria", adică sub membrana epitelială bazală, unde se găsesc plasmocitele secretoare de IgA.

Copiii se nasc fără IgA serică, pe care o primesc prin laptele matern unde se găsește în concentrații ridicate. Sinteza proprie începe cam la 30 de zile de la naștere. De aceea, copiii sugari care se alimentează natural (cu lapte matern) sunt mai puțin expuși la infecții intestinale și respiratorii, în comparație cu cei ce se alimentează artificial sau mixt. Indivizii care au un nivel scăzut de IgA suferă de infecții ale căilor respiratorii, datele dovedind încă o dată rolul acestei clase de imunoglobuline în protecția intestinală și respiratorie. Probabil că ea reglează numărul germenilor și mai ales componența florei bacteriene de la nivelul mucoaselor. Indivizii cu deficit IgA (sunt cam 1 la 700 de subiecți) sunt susceptibili la boli autoimune, la infecții ale căilor respiratorii etc. În serul acestora, nivelul IgG și IgM se menține în limite normale și, uneori, pot fi puși în evidență anticorpi anti-colagen.

Clasa IgD a fost descoperită în anul 1965 de către D.S. ROWE și F.L. FAHEY în serul unui bolnav cu mielom. Nivelul său fiziologic în ser este foarte redus, fiind de cca. 300 de ori mai mic decât cel al anticorpilor din clasa IgG (cca. 40 mg/l) concentrația nedeșășind 1% din totalul imunoglobulinelor. Molecula, cu greutatea moleculară de cca. 180 kD și constanta de sedimentare 7 S este alcătuită din două lanțuri  $\delta$  și două lanțuri L de tip k sau  $\lambda$ . Lanțul  $\delta$  are trei domenii constante și o regiune balama foarte lungă (65 reziduuri de aminoacizi) responsabilă de marea susceptibilitate a acestei clase la proteoliza enzimatică. Lanțurile  $\delta$  sunt puternic glicozilate (12%). Catabolismul acestei molecule este extrem de rapid, perioada sa de înjumătățire fiind de cca. trei zile. Există în organism sub formă de molecule solubile, care circulă în plasma sanguină (0,03-0,04 g/l) și sub formă de receptor pentru antigen pe membrana limfocitelor B care are un segment hidrofob la extremitatea COOH terminală prin care molecula se fixează la membrana celulară. Datorită existenței acestui segment, masa moleculară a receptorului IgD este mai mare decât cea a moleculei libere. Celelalte proprietăți ale IgD seric și membranar





Se pare că activitatea biologică, în special a moleculelor serice, este de importanță minoră. IgD nu fixează și nu activează complementul, nu traversează placentă, nu sensibilizează pielea cobaiului, nu provoacă degranularea mastocitelor, nu se fixează citofil pe monocite sau limfocite. Ar juca un rol important numai la nivel celular, ca receptori pentru antigen pe limfocitele B, asociați cu receptorii IgM monomeri. S-ar putea să joace un rol de receptor activ în diferențierea celulară și în instalarea memoriei celulare.

Concentrația în ser crește de la naștere până la vârsta de 15 ani, după care rămâne la un nivel constant toată viața individului, cu excepția unor stări patologice ca astmul bronșic, boala reumatoidă, boala Hodgkin, leucemia limfatică cronică, lupusul eritematos și, bineînțeles, mielomul IgD unde se înregistrează valori mai mari decât cele obișnuite. De asemenea, pragul IgD seric crește în serul femeilor gravide, creștere care este mai accentuată în momentul expulziei fătului, precum și în unele infecții cronice la copii.

Au fost evidențiați anticorpi aparținând acestei clase față de penicilină, insulină, toxină difterică, lactoproteine etc.

**Clasa IgE** a fost descoperită de către K. ISHIZAKA în anul 1966, constituind așa-numitele molecule de "anticorpi reaginici", sau "anticorpi sensibilizanți ai pielii" sau "hemocitotropi". Ca și celelalte Ig, molecula IgE este alcătuită din două lanțuri grele ( $\epsilon$ ) și două ușoare (L) de tip k sau  $\lambda$  (fig. 77) cu greutatea moleculară de 180 kD și constanta de sedimentare de cca. 8 S. Lanțurile  $\epsilon$  au 5 domenii și conțin un procent mare de hidrați de carbon (cca. 11%). Greutatea moleculară a lanțurilor grele ale acestei molecule este foarte mare (cca. 75kD). În colostru, concentrația este crescută, de ordinul sutelor de nanograme, dar ulterior în laptele matern scade, rămânând la valori crescute numai la mamele cu alergie. Nu se transmite transplacentar, fătul primind-o prin colostru și începând s-o sintetizeze încă din viața embrionară.

Atât moleculele de IgD cât și cele de IgE sunt foarte sensibile la acțiunea temperaturilor ridicate, denaturându-se practic total după încălzirea serului la +56°C timp de 30 de minute, fapt neînregistrat la celelalte clase de Ig. Încălzirea IgE duce la pierderea capacității sale reaginice, de stimulare a degranulării bazofilelor și mastocitelor, dar nu și la modificarea capacității sale de recunoaștere specifică a antigenului, adică la alterarea funcției de anticorp. Anticorpul din clasa IgE nu activează complementul, se leagă citofil la receptori  $Fc\epsilon$  de pe





Evaluarea cantitativă a nivelului seric al Ig este fără îndoială utilă, deoarece poate furniza informații privind o parte din potențialul de răspuns imun al organismului, și anume, cel al imunității umorale. Valorile excesiv de crescute sau de scăzute semnalează existența unor hiperimunoglobulinemii (proteine-mielom) sau hipoimunoglobulinemii. Dar, în activitatea curentă a laboratoarelor clinice, este bine de interpretat cu prudență semnificația rezultatelor, obținute, deoarece "limitele normale" ale concentrațiilor de imunoglobuline în ser se încadrează în niște granițe foarte "elastice". Ele sunt influențate de o serie de factori de mediu, cum ar fi alimentația, temperatura mediului ambiant, sau de alți factori ca de pildă existența unor endemii, vaccinări, infecții localizate la nivelul unui organ sau sistemice etc. După cum rezultă din tabelul 43, aceste valori sunt condiționate nu numai de localizările geografice, care au specificul lor în ce privește influența mediului ambiant și a condițiilor socio-economice, dar și de timp, existând modificări periodice care deplasează într-un sens sau altul "valorile medii".

Tabelul 43

**"Limite normale" ale unor clase de imunoglobuline existente  
la populația adulților aparent sănătoși**

Clasa Ig	A		B		C	
	U.I./ml	mg %	U.I./ml	mg %	U.I./ml	mg %
IgG	100 - 200	800 - 1600	99 - 250	800 - 2000	120 - 250	960 - 2000
IgA	70 - 250	100 - 360	63 - 320	90 - 450	90 - 290	128 - 420
IgM	100 - 200	84 - 170	70 - 330	60 - 280	120 - 300	90 - 240
IgD	?	?	100	0,3 - 30	70 - 85	1 - 12

A=limitele valorilor considerate a fi normale la populația Europei Occidentale; B="limitele valorilor normale" în populația țării noastre în anul 1986; C="limite normale" în țara noastră în 1990.

După cum se poate observa din tabel, uneori diferențele între limitele inferioare și cele superioare sunt foarte mari, astfel că, atunci când la un pacient se înregistrează o valoare care depășește cu puțin limita superioară sau este cu puțin sub limita inferioară, diagnosticul de hiper- sau hipogammaglobulinemie este mai mult decât hazardat. Sunt semnificative rezultatele care au cifre extrem de mici sau mari, dar nu cele care sunt la limite discutabile.

**Specificitatea alotipică a moleculelor de imunoglobuline** definește caracterul antigenic particular al acestora, apărut la un grup de indivizi din cadrul aceleiași specii, ca urmare a unor modificări minore în secvența aminoacizilor de la nivelul regiunilor constante ale lanțurilor H sau L. Aceste molecule, atunci când sunt inoculate la alți subiecți aparținând speciei respective, sunt recunoscute ca străine, generează răspuns imun prin anticorpi și sunt eliminate ca orice alt antigen. Alotipia este expresia unui polimorfism în structura genelor care codifică pentru regiunile C ale lanțurilor H și L, așa că structurile alotipice vor fi prezente numai la nivelul domeniilor  $C_H$  și  $C_L$  dar nu și la nivelul celor  $V_H$  sau  $V_L$  (fig. 78). Polimorfismul genetic de la nivelul moleculelor de Ig umană a fost descris pentru prima dată de către R. GRUBB în 1956, primul sistem alotipic cunoscut fiind sistemul Gm (gamma marker) de la nivelul lanțului  $\gamma$  al Ig.

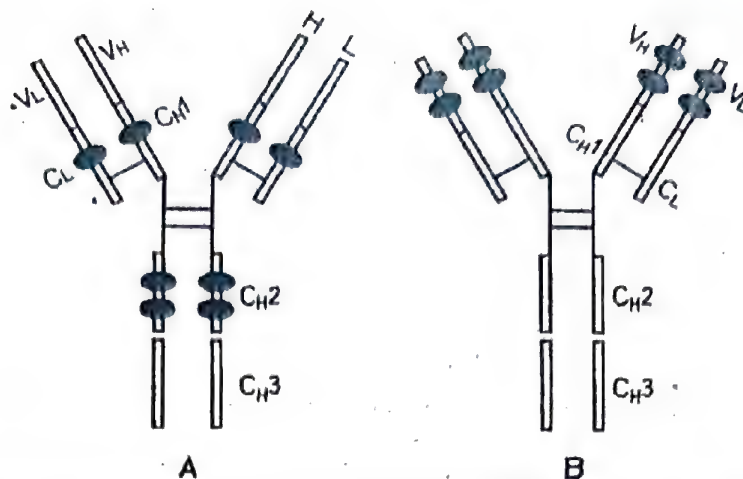


Fig.78. Poziția markerilor alotipici (A) și idiotipici (B) la nivelul moleculelor de imunoglobulină. Markerii alotipici sunt situați la nivelul domeniilor  $C_L$  ale lanțului ușor și  $CH1$ ,  $CH2$  ale lanțului greu. Markerii idiotipici sunt situați la nivelul domeniilor variabile ( $V_H$  și  $V_L$ ), iar cei izotipici pe domeniile înalt constante ( $CH3$ ).

Se cunosc 5 tipuri de determinanți alotipici:

1. Km sau markerii lanțului  $L_k$  (denumiți anterior InV);
2. Gm sau markerii lanțului  $\gamma$  (IgG);
3. Am sau markerii lanțului  $\alpha$  (IgA);
4. Em sau markerii lanțului  $\epsilon$  (IgE);
5. IsF sau markerii lanțului  $\gamma_1$ .

Alotipiile Km sunt dependente de alelele Km1, Km1,2 și Km3 generate de modificarea intervenită în poziția aminoacizilor de la nivelul pozițiilor 153 și 191 (tabelul 44).

Tabelul 44

Alotipiile Km și distribuția lor în populație

Alotipia	Aminoacizi existenți în poziția		Frecvența în populație
	153	191	
Km 1,2	Ala	Leu	Indienii din America de Sud
Km 1	Val	Leu	Negroizi
Km 3	Ala	Val	Caucazieni

În cazul specificităților Km, este de obicei o unică substituție a unui reziduu de aminoacid din poziția 191 a lanțului  $L_k$ , la nivelul regiunii constante (C) a acestuia. Dacă transpoziționarea  $C_k^{191}$  corespunde unei specificități alotipice, cea  $C_\lambda^{191}$  este o izotipie, adică provine din duplicarea unei gene, urmată de mutații care generează caracterele antigenice  $Oz^+ / Oz^-$ , precum transpoziționarea  $C_\lambda$ , determinantă caracteristică a izotipiei  $Ker^+ / Ker^-$  care permite formarea celor trei tipuri de lanț  $L_\lambda$  cu caractere antigenice diferite.

Alotipiile Gm sunt situate la nivelul domeniilor  $C_H3$  ale lanțurilor grele ale subclaselor IgG<sub>1</sub> (G<sub>1m</sub>), IgG<sub>2</sub> (G<sub>2m</sub>) și IgG<sub>3</sub> (G<sub>3m</sub>). Sistemul Gm este foarte polimorf cunoscându-se până în prezent cca. 28 de alotipii; cea mai mare parte a



determinanților antigenici fiind, ca și în cazul alotipiilor Km, epitopi condiționați de structura terțiară a lanțurilor grele ale moleculelor IgG.

Subclasele IgG lipsite de markeri alotipici sunt notate nGm sau "izo-alotipice" (aceleași izotipii).

Sistemul Gm este util pentru caracterizarea unei populații pe baza markerilor săi genetici (tabelul 45).

Tabelul 45

Markerii alotipici Gm exprimați predominant la grupe de populație

Grupa de populație	Markerii Gm
Caucazieni	Gm3, Gm5, Gm10, Gm11, Gm13, Gm14, Gm26, Gm27, Gm33
Mongoloizi	Gm1, Gm17, Gm21, Gm26, Gm27, Gm28
Negroizi	Gm5, Gm6, Gm10, Gm11, Gm13, Gm14, Gm24, Gm27

În sistemul Gm sunt cca. 28 de factori alelici exprimați pe diferite molecule IgG dar, ceea ce este foarte important de reținut, acești factori nu sunt exprimați toți pe aceeași moleculă. Dat fiind că este vorba de modificări de poziție ale unui număr redus de aminoacizi, această modificare poate avea loc la un anumit izotip sau, altfel spus, la un lanț care are o anumită secvență a aminoacizilor, caracteristică tuturor lanțurilor polipeptidice ale speciei respective din cadrul unei anumite clase de imunoglobulină. De exemplu, la IgG1, un reziduu Cys este înlocuit cu unul Arg la poziția 214, motiv pentru care se instalează o schimbare a specificității antigenice, adică a specificității alotipice a lanțului respectiv. Așa se explică și relația strânsă care există între izotipie și alotipie, adică între caracterele antigenice ale moleculelor de imunoglobulină specifice tuturor indivizilor unei specii și particularitățile antigenice care definesc numai un grup de indivizi din cadrul acelei specii. În consecință, unele specificități vor fi prezente la unele subclase de imunoglobuline, iar altele, la alte subclase. De pildă, specificitățile Gm1 și Gm17 sunt frecvente la subclasele IgG 1, cele Gm8 sau Gm23 la subclasa IgG2, cele Gm5 și Gm21 la subclasa IgG3 etc. Numerotarea acestor specificități alotipice se face de regulă cu cifre arabe, deși unii folosesc și alfabetul latin (tabelul 46).

**Alotipiile A2m.** Pe lanțul C  $\alpha$  2 al subclasei IgA2, dar nu pe C  $\alpha$  1, sunt exprimate alotipurile A2m(1), A2m(2) și izoalotipul nAm(2). Alotipul A2m(2) este frecvent exprimat la populația mongoloidă și slab exprimată la negrozii.

Specificitatea Am se caracterizează prin lipsa reziduuului Cys în poziția 130, reziduu implicat în formarea legăturilor disulfidice (-S-S-) dintre lanțurile grele  $\alpha$  2 și cele ușoare (L) ale moleculei IgA2. Din această cauză, aceste lanțuri sunt unite între ele nu prin legături disulfidice (-S-S-) ci prin legături de hidrogen (vezi fig. 73).

**Alotipul Em.** Singura specificitate cunoscută este Em(1) pe lanțul  $\epsilon$  al moleculei de IgE.

Nomenclatura și distribuția alotipilor imunoglobulinelor

Clasa sau subclasa de imunoglobulină	Domeniul	Terminologia	
		Alfabetică	Numerică
IgG1	C <sub>H</sub> 3	G1m(a)	G1m(1)
	C <sub>H</sub> 3	G1m(x)	G1m(2)
	C <sub>H</sub> 1	G1m(f)	G1m(3)
	C <sub>H</sub> 1	G1m(z)	G1m(17)
IgG2	C <sub>H</sub> 2	G2m(n)	G2m(23)
IgG3	C <sub>H</sub> 3	G3m(b0)	G3m(11)
	C <sub>H</sub> 2	G3m(b1)	G3m(5)
	C <sub>H</sub> 3	G3m(b3)	G3m(13)
	C <sub>H</sub> 2	G3m(b4)	G3m(14)
	C <sub>H</sub> 3	G3m(b5)	G3m(10)
	C <sub>H</sub> 3	G3m(c3)	G3m(6)
	C <sub>H</sub> 3	G3m(c5)	G3m(24)
	C <sub>H</sub> 2	G3m(g)	G3m(21)
	C <sub>H</sub> 2	G3m(u)	G3m(26)
	C <sub>H</sub> 3	G3m(v)	G3m(27)
	C <sub>H</sub> 3	G3m(s)	G3m(15)
	C <sub>H</sub> 3	G3m(t)	G3m(16)
	C <sub>H</sub> 3	G3m(g5)	G3m(18)
IgA2	C <sub>H</sub> 2	-	A2m(1)
	C <sub>H</sub> 3	-	A2m(2)
IgE	?	-	Em(1)
-	C <sub>L</sub>		Km(1)
	C <sub>L</sub>		Km(2)
	C <sub>L</sub>		Km(3)

*Specificitatea IsF* sau "Imunoglobulina San Francisco" este localizată pe lanțul greu al subclasei de molecule IgG1.

Deci, specificitățile alotipice definesc de regulă modificări în poziția a 1-2 reziduuri de aminoacizi din secvența lanțurilor, modificări moștenite și transmise conform legilor lui Mendel de segregare a caracterelor. Uneori însă, ele sunt dependente de transpoziționarea unui singur aminoacid.

Dar nu numai modificările în poziția aminoacizilor pot genera specificitățile alotipice. Același efect îl poate avea și modificarea poziției unor hidrați de carbon. Astfel, în cursul hemopatiilor sau grefelor de măduvă alogenă, se realizează o mare frecvență a fenotipurilor Km, probabil ca urmare a decapării unui grup de hidrați de carbon de la nivelul aminoacidului situat în poziția Km 123. Bineînțeles că, de multe ori, expresia serologică a multor specificități alotipice se datorește



structurii cuaternare a moleculei, în sensul că, prin torsionări particulare ale lanțului primar, sunt expuse la suprafața secvenței de aminoacizi care în mod obișnuit rămân ascunse la moleculele de imunoglobulină ale indivizilor speciei respective.

În concluzie, alotipiile umane au fost puse în evidență pe lanțurile grele  $\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \alpha 2$  și pe lanțurile  $L_k$ , dar nu pe lanțurile  $\mu, \alpha 1$  și  $\delta$  sau pe lanțurile ușoare  $L \lambda$ .

În afară de om, bine cunoscute sunt specificitățile alotipice la șoarece și la iepuri, care au fost descoperite încă din anul 1956 de către francezul J. OUDIN. De asemenea, există specificități alotipice și la cobai, păsări, rumegătoare etc.

**Excluderea alelică.** Plasmocitele care secretă imunoglobuline suferă o "excludere alelică" atât pentru receptorii imunoglobulinici de suprafață cât și pentru imunoglobulinele secretate. Ca urmare a acestui fenomen, fiecare celulă sintetizează o singură specificitate alotipică, celelalte fiind represate. De exemplu, dacă un plasmocit sintetizează specificitatea  $Km_{1,2}$ , adică dacă are reziduul Leu la poziția 191 a lanțului  $C_k$ , atunci va avea supresată specificitatea  $Km_3$  în care, la poziția 191 de pe  $C_k$  se găsește reziduul Val. Această inhibiție funcțională a unui caracter antigenic, indusă de dominația altui caracter, se numește excludere alelică și poate fi întâlnită atât la nivelul unei singure celule sau clone celulare, cât și la nivelul întregului organism. La nivelul unei celule sunt represate genele de pe cromozomul alelic, în organism putându-se însă găsi și caractere codominante. De exemplu, există celule cu caracter dominant  $Gm_1$  și celule cu caracter dominant  $Gm_{25}$ . În întregul organism, se pot însă găsi și celule care exprimă ambele caractere, nici unul dintre ele nedominându-l pe celălalt. Deci, când este exprimat numai caracterul  $Gm_1$ , atunci acesta îl domină pe  $Gm_{25}$ , sau invers,  $Gm_{25}$  poate domina, adică poate exclude alelic pe  $Gm_1$ , sau nu poate fi excludere alelică și atunci caracterele sunt codominante, fiind exprimate simultan. Poate fi și situația în care este excludere alelică la nivelul celulei pentru un caracter (de altfel aceasta este aproape o regulă) dar, la nivelul întregului organism, să existe celule care exprimă un caracter și alte celule care exprimă alt caracter, astfel că, pe ansamblu, caracterele sunt "codominante". În cazul în care o clonă întreagă celulară este eliminată, atunci alela nu va mai fi prezentă și va dispărea caracterul codominant. Această situație poate fi realizată experimental cu seruri anti-alotip. De exemplu, administrarea masivă de ser anti-alotip  $b_4$  la iepurele nou-născut, heterozigot  $b_4/b_5$ , suprimă expresia caracterului  $b_4$ , alotipul  $b_5$  devenind dominant.

În general, evenimentele de recombinare care conduc la construcția unei gene active a lanțului  $H$  sau  $L$  au loc numai pe unul dintre cei doi cromozomi alelici. Astfel, multe celule  $B$  sintetizează lanțurile  $L$  și  $H$  ale uneia dintre cele două forme alotipice alternative, care este specificată de către genele ei alelice. Acest fenomen, adică exprimarea numai a unei alele în fiecare celulă, reprezintă efectul excluderii alelice. Încă nu se știe dacă această excludere este un proces activ, adică dacă recombinarea care are loc pe un cromozom inhibă recombinarea pe cromozomul alelic, sau este un proces pasiv, în sensul că evenimentul de combinare are o rată mai mare de erori, iar posibilitatea evenimentelor reușite pe ambii cromozomi de pe aceeași celulă este foarte mică.

Există o anumită ierarhie în dezvoltarea recombinărilor. Astfel, la om, în linia limfocitară  $B$ , recombinările genei  $H$  preced pe cele ale genei  $k$ , care, la rândul lor, preced pe cele ale genei  $\lambda$ , astfel că ordinea este  $H - k - \lambda$ . În acest fel, într-o celulă este exprimat un singur lanț  $L$ . Consecința practică a acestor evenimente este aceea că fiecare celulă  $B$  exprimă receptori compuși dintr-un singur tip de lanț  $L$  și o singură varietate de regiune variabilă a lanțului greu ( $V_H$ ). Toate acestea



sprijină teoria selecției clonale, cel puțin la nivelul celulei *B* unde, deocamdată, fiecare progenitoare clonală exprimă anticorpi cu o specificitate de recunoaștere unică. Deci, prin excluzie alelică se asigură sinteza de către o singură celulă numai a moleculelor de anticorpi aparținând unei clase, subclase și alotip unic.

**Specificitatea idiotipică** a fost descoperită de către H.O.KUNKEL, J. OUDON și L. MITCHEL, în anul 1963.

Prin specificitate idiotipică se înțelege caracterul antigenic particular pe care-l capătă molecula de anticorp care aparține unui individ imunizat cu un anumit determinant antigenic. Deci, această specificitate este expresia modificărilor sterice de la nivelul *Fc* induse de către un anumit antigen, de unde și localizarea ei numai în regiunile *V<sub>H</sub>* și *V<sub>L</sub>* ale lanțurilor moleculei. Cu alte cuvinte, dacă un individ este imunizat cu un epitop oarecare, să zicem *Z*, moleculele de tip Ig anti-*Z* vor avea *Fc* de o conformație complementară epitopului *Z*, conformație care, la rândul ei, este recunoscută ca non-proprie de către alte limfocite ale organismului propriu, care vor sintetiza anticorpi pentru a o elimina. Această conformație sterică specifică antigenului *Z* se numește **specificitate idiotipică** ce, după cum spuneam, este situată numai la nivelul regiunii variabile a moleculei, deci la extremitatea *NH<sub>2</sub>* a *V<sub>H</sub>* și *V<sub>L</sub>*. Dacă un iepure, de exemplu, este imunizat cu un antigen dat, iar moleculele lui de IgG anti- acest antigen sunt păstrate *in vitro*, iar după un anumit timp, când titrul anticorpilor scade, i se inoculează propriile lui molecule, el va recunoaște ca străin partea din situsul combinativ complementară antigenului și va produce anticorpi față de ea. Deci, va produce anticorpi anti-idiotipici, fiecare ser anti-idiotipic precipitând doar serul cu specificitate idiotipică proprie. Dacă, de exemplu, mai mulți iepuri sunt imunizați cu un anumit polizaharid, iar serurile lor anti- polizaharidul dat sunt folosite pentru hiperimunizarea altor iepuri în vederea obținerii de seruri anti-idiotip, aceste seruri vor reacționa numai cu serurile cu care au fost imunizate animalele, respectiv dacă iepurele nr.2 a fost imunizat cu serul anti-polizaharid al iepurelui 5, el va precipita numai serul iepurelui 5, nu și cel al altor iepuri, cu toate că toți au răspuns cu anticorpi anti-același determinant antigenic. Deci, specificitatea anti-idiotip dezvoltă reacții omoloage. Dar, în funcție de epitopul folosit, se cunosc și reacții heterologe în care un ser antiidiotip reacționează cu seruri imune provenite de la alți indivizi imunizați cu același antigen. Este cazul iepurilor imunizați cu streptococi, cu *Salmonella abortus* etc. Aceasta demonstrează pe de o parte că specificitatea idiotipică poate cuprinde o arie restrânsă sau mai puțin restrânsă din suprafața situsului combinativ, iar pe de altă parte, că ea nu se transmite ereditar, după legi genetice simple, așa cum este cazul celei alotipice. Idiotipia anticorpilor se caracterizează prin aceea că aparțin diferitelor clase de Ig (IgM, IgG etc.), apar în diferite stadii ale imunizărilor și au funcții diferite față de antigene.

În cursul unei imunizări, de exemplu, fie că sunt sau nu sunt întrerupte inoculările, idiotipia poate să apară sau să dispară. De exemplu, determinanții antiidiotipici ai anticorpilor anti-paraaminobenzoat sunt înlocuiți cu alții pe parcursul imunizărilor. Sunt frecvente cazurile când, la o sângerare a animalelor imunizate, pentru recoltarea de ser imun, se constată existența unei reacții idiotip-antiidiotip, pentru ca la sângerarea următoare această reacție să nu mai fie prezentă din cauza dispariției specificității idiotipice respective.

Se pare că aceeași specificitate idiotipică se instalează numai în condiția în care determinismul antigenic este purtat de aceeași moleculă, adică este legat la aceeași grupare purtătoare. Numai în aceste condiții se poate instala secvența evenimentelor care duc la sinteza anticorpilor și de care depinde specificitatea idiotipică, de unde concluzia că intervenția moleculei ca un tot întreg este un



eveniment esențial în formarea anticorpilor. Și în cazul specificităților idiotipice este cunoscută *supresia* idiotipică. Șoarecii inoculați neonatal cu un ser anti-un anumit idiotip nu mai sintetizează anticorpi cu această specificitate; moleculele de Ig își păstrează funcțiile de anticorpi, dar cu alte specificități idiotipice. Specificitățile idiotipice sunt implicate în mecanisme de reglare a răspunsului imun (vezi teoria rețelei) și, pe baza lor, se fac încercări de obținere a unor vaccinuri în care să se folosească, în locul unor virusuri sau bacterii, anticorpi antiidiotip din generația a doua, care au conformația identică epitopilor respectivi și care pot induce reacții imune identice cu cele induse de agenții infecțioși respectivi, dar fără pericolele pe care le conferă manipularea acestora.

**Afinitatea și aviditatea anticorpilor** se referă la forța de recunoaștere și legare a antigenului de către un singur situs combinativ sau de către toate situsurile combinate ale moleculei.

Afinitatea intrinsecă este forța de atracție dintre un singur situs combinativ și un singur epitop, respectiv constanta de asociere K. Reacția antigen-anticorp fiind reversibilă, în situația de echilibru valoarea constantei K este dată de relația

$$K = \frac{HS}{H_i \times L}, \text{ în care:}$$

H = concentrația haptenei monovalente legate;

S = concentrația situsului combinativ care a legat haptena H;

H<sub>i</sub> definește concentrația haptenei libere, nelegată;

L = concentrația situsurilor combinate libere care nu au fixat haptena.

Practic, valoarea constantei de afinitate K se determină prin măsurarea concentrației haptenei libere și a celei legate, în situația de echilibru. Determinările se fac într-un sistem format dintr-o populație dată de anticorpi cu o anumită specificitate și o populație de haptene. Se măsoară concentrația haptenei libere și a celei legate în situație de echilibru, fie prin procedeul "echilibrului de dializă", fie prin metode de "stingere a fluorescenței" (fig. 79). În echilibru de dializă, două soluții, dintre care una cu anticorpi și alta cu haptenă, se găsesc într-un vas despărțit de un perete format dintr-o membrană de dializă. După atingerea echilibrului, se măsoară haptena care a fost marcată fie prin colorare, fie radioactiv, rămasă în partea de vas în care a fost introdusă la începutul experienței, și se calculează cantitatea de haptenă legată prin scăderea haptenei libere totale din cantitatea inițială. În acest mod de determinare, se pot folosi și anticorpi nepurificați, respectiv poate fi folosit serul imun ca atare.

Tehnica fluorescenței se bazează pe proprietatea triptofanului de a emite o radiație de fluorescență cu o undă de 340-350 nm. Când situsul combinativ este ocupat de haptenă, se înregistrează stingerea maximă a fluorescenței. Tehnica implică folosirea de anticorpi purificați și este aplicabilă unui număr redus de haptene (care sunt bogate în triptofan).

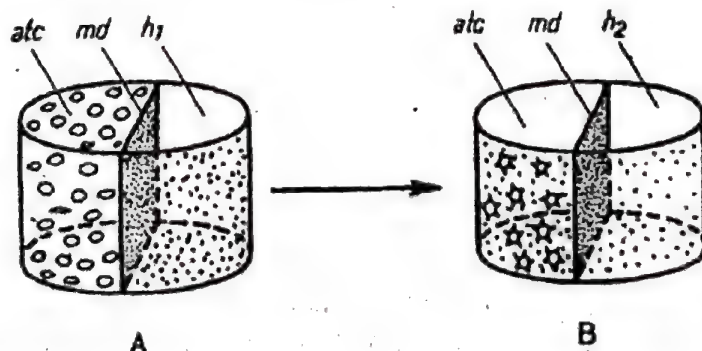


Fig.79. Principiul metodei "echilibrului de dializă". În vasul A, despărțit prin membrana de dializă md în două compartimente diferite, se găsesc: într-un compartiment epitopii marcați (h<sub>1</sub>), iar în altul anticorpii (atc). După realizarea echilibrului (B), se calculează cantitatea de epitopi legați specific de către anticorpi, scăzându-se (din cantitatea inițială de h<sub>1</sub> din compartimentul cu epitopi) cantitatea rămasă (h<sub>2</sub>).



Afinitatea intrinsecă este condiționată de doza de antigen și de durata de imunizare. La doze mari de antigen, sunt selecționate molecule cu afinitate mică, iar la doze mici, molecule cu afinitate mare. La fel, prelungirea timpului de imunizare selectează moleculele de anticorpi cu afinitate mică.

**Aviditatea anticorpilor**, sau **aviditatea funcțională**, definește forța de atracție dintre toate situsurile combinate ale unei molecule de anticorpi și un antigen complex. Cu cât anticorpul are mai multe valențe, adică mai multe situsuri combinate, cu atât aviditatea va fi mai mare. De exemplu, un anticorp bivalent leagă un epitop de 100 de ori mai intens decât un singur situs combinativ, iar unul cu 10 situsuri combinate are o aviditate de 20 de ori mai mare decât unul bivalent. În fond, aviditatea ar putea fi definită și ca "suma afinităților intrinsece ale unei molecule de anticorp". Prin implicarea mai multor situsuri combinate în legarea unui antigen complex, se antrenează o energie de legare crescută, stabilitatea complexelor crescând semnificativ. Aceasta are o mare importanță biologică, așa explicându-se de ce primii anticorpi care apar sunt pentavalenți, cu 10 situsuri combinate, din clasa IgM. Ei fixează "ireversibil" virusurile sau bacteriile, preluând, până la apariția altor clase de anticorpi, toate funcțiile de apărare umorală.

**Molecule omogene de imunoglobuline.** Caracteristica majoră a moleculelor de imunoglobuline este eterogenitatea funcțiilor lor de recunoaștere a antigenelor și, bineînțeles, eterogenitatea lor structurală, condiționată de destinația funcțională a lor. Dar, există și situații în care populația moleculară a imunoglobulinelor este omogenă, atât din punct de vedere al potențialului și specificității de recunoaștere, cât și din punct de vedere structural. Această omogenitate este prezentă uneori la moleculele normale de imunoglobulină sau la cele patologice. Ea poate fi generată natural, sau realizată de către om prin hibridoame celulare.

**Imunoglobuline omogene normale.** Omogenitatea moleculelor normale de Ig este condiționată de către doi factori, și anume, de natura antigenului și de modul de proliferare a clonei stimulate. De exemplu, structura particulară a antigenelor timo-independente permite stimularea unei clone unice de limfocite B care vor sintetiza molecule de anticorp cu un înalt grad de omogenitate. Este cazul polizaharizilor pneumococici (S III) formați din simple unități repetitive care induc formarea de anticorpi omogeni în concentrație ridicată, similari celor din proteinele mielom. În funcție de modul de proliferare a clonei de limfocite stimulată se cunosc proteinele mielomatoase cu activitate de anticorp și anticorpii monoclonali obținuți *in vitro* prin fuzionarea unui limfocit cu o celulă neoplazică.

Proteinele mielom apar în cazul proliferării neoplazice a unei clone de limfocite care secretă anticorpi cu o specificitate unică față de un anumit determinant antigenic. În afară de apariția lor spontană, au putut fi induse și experimental prin inocularea la șoarece de uleiuri minerale. Au fost obținute așa-zisele proteine mielom MOPC (Mineral Oil Plasmacitomas Cells), caracterizate prin sinteza de diverse molecule de anticorpi cu specificități diferite. Deoarece aceste proliferări neoplazice sunt transplantabile, au putut fi obținute cantități mari de proteine mielom cu ajutorul cărora s-au putut determina secvența aminoacizilor din lanțurile Ig, funcțiile moleculelor și fragmentelor de moleculă etc. De exemplu, proteina mielom MOPC 603 este o tumoră care secretă IgA de șoarece cu funcție de anticorp anti-fosforilcolină. Cu ajutorul acestor molecule s-a putut studia structura fragmentului *Fab*. La om, au fost identificate diverse proteine mielom, care au permis descoperirea existenței claselor și subclasselor de imunoglobulină.

– **Anticorpii monoclonali** sunt de fapt o variantă *in vitro* a proteinelor de mielom, deoarece și într-un caz și în celălalt este vorba de proliferarea unei singure clone



de limfocite care secretă anticorpi cu o anumită specificitate. În principiu, metoda constă din fuzionarea prin diverse mijloace (virus Sendai, polietilenglicol etc.) a unui limfocit cu o celulă neoplazică. Limfocitul aduce ca "zestre" funcția sa secretorie de anticorp și enzima hipoxantinfosforibozil-transferaza care catabolizează hipoxantina, iar celula neoplazică aduce capacitatea de multiplicare și proliferare intensă. După fuzionarea celor două celule (fuzionează cca. o celulă din 1 000 de celule), se adaugă în mediul de cultură hipoxantină, aminopterină și timină (mediul HAT) care vor omorî celulele mielomatoase cu deficit în hipoxantinfosforibozil-transferază. Celulele normale, care nu au capacitatea de multiplicare a celor neoplazice, mor în cursul pasajelor următoare, rămânând viabile numai celulele fuzionate care au moștenit atât capacitatea de proliferare cât și cea de catabolizare a hipoxantinei. Acestea sunt dispersate în plăci cu godeuri distribuindu-se câte o singură celulă în fiecare godeu. După timpul necesar proliferării celulei, deci proliferării unei clone celulare, se determină natura anticorpului sintetizat și eliberat în mediu de cultură. Se selectează clona dorită care se multiplică în continuare *in vitro*, după care se inoculează intra-peritoneal la șoarece unde se va înmulți și va sintetiza anticorpi cu specificitate de recunoaștere unică, deoarece provin dintr-o clonă unică, adică dintr-o populație de limfocite generată de către o singură celulă (fig. 80). Șoarecii la care se inoculează clona de celule fuzionate trebuie să fie consangvini, adică identici din punct de vedere genetic cu cei de la care provin celulele fuzionate. În caz contrar, ei vor respinge aceste celule recunoscându-le ca străine de organismul lor, adică non-proprie. De la un șoarece se pot recolta zilnic până la 20 de mg de proteină / ml de lichid ascitic. Dacă se ține cont că zilnic se pot recolta câte 2-10 ml de lichid, atunci este lesne de realizat cât de eficientă și bogată în randament este această metodă.

Au fost obținuți anticorpi monoclonali față de diverși epitopi de pe membrana limfocitelor, cu ajutorul cărora s-a realizat în mare măsură "inventarul" antigenic al acestora, față de diferite componente chimice, antigene de origine animală, vegetală etc. În afară de utilizarea lor în cercetare, se încearcă și introducerea în practica medicală clinică, în special în imunoterapia antitumorală și antivirală nu însă fără a se întâmpina o serie de dificultăți. Dacă producția lor *in vivo* pe șoarece este simplă, folosirea omului în acest scop este imposibilă, deoarece este greu de imaginat ca cineva să accepte să fie inoculat intraperitoneal cu hibridoame pentru a deveni "producător" de lichid de ascită. Pe de altă parte, inocularea repetată a anticorpilor monoclonali de origine murină la om, deci inocularea unor produse xenogene, stimulează răspunsul imun al gazdei și neutralizează produsul inoculat. Pentru depășirea acestei dificultăți, s-a încercat obținerea de "anticorpi himerizați", niște hibrizi formați din regiunile variabile (*Fab*) murine și cele constante (*Fc*) umane sau, mai corect spus, alcătuirea unei molecule formate din  $V_H$  și  $V_L$  murine asociate la  $C_L$  și  $C_H1$ ,  $C_H2$ ,  $C_H3$  umane (fig. 81). Dar, s-a constatat că și acești hibrizi sunt imunogeni, răspunsul imun față de domeniile variabile murine din molecula hibridă fiind destul de puternic. De aici necesitatea ca anticorpii monoclonali să fie "umanizați" adică să posede toată molecula de IgG uman cu excepția celor 6 domenii hipervariabile de complementaritate (CDR) de la nivelele  $V_L$  și  $V_H$  ale anticorpilor monoclonali murini care se introduc între secvențele cadru (*Fr*) ale regiunilor hipervariabile umane (fig. 82). Dar și acești anticorpi "umanizați" ridică unele probleme, în sensul că au o afinitate de legare foarte scăzută, probabil datorită distorsionării regiunilor hipervariabile CDR murine de către regiunile cadru (*Fr*) umane, între care au fost inserate.

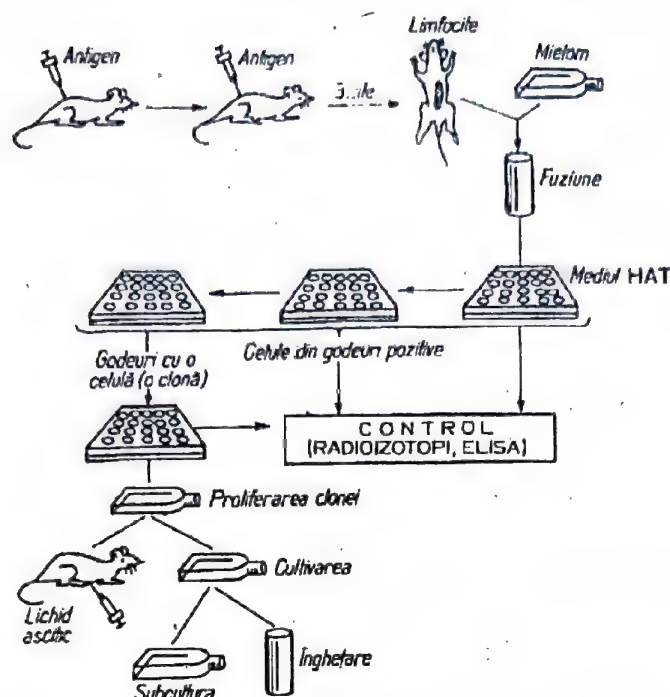


Fig.80. Principiul obținerii anticorpilor monoclonali. Limfocitele B de șoarece, stimulate antigenic cu un anumit epitop, sunt fuzionate cu celule mielom. După dispersia celulelor în plăci cu godeuri, avându-se grijă ca în fiecare godeu să fie o singură celulă hibridată, se identifică populația de celule fiice rezultată care, derivând dintr-o singură celulă, vor secreta anticorpul dorit, cu specificitate pentru un singur epitop.

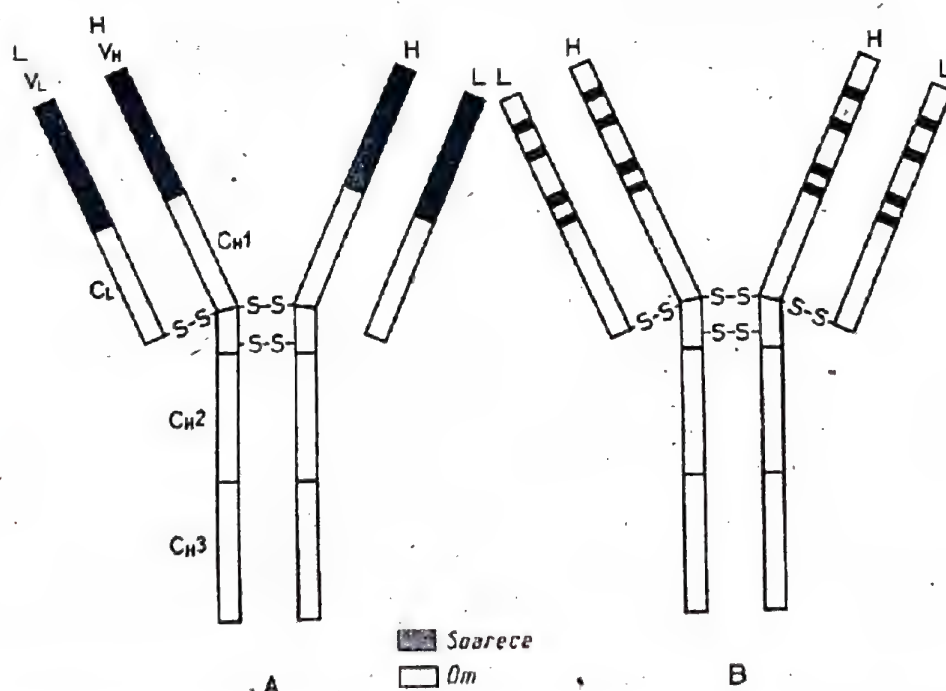


Fig.81. Anticorpi monoclonali "himerizați". La domeniile constante ale moleculei de IgG umană se "grează" domeniile variabile ale moleculei de IgG murină cu specificitate de recunoaștere pentru anticorpul dorit. Această "grefare" poate fi realizată cu întreaga secvență a domeniilor VL și VH (A) sau numai cu "regiunile CDR de determinare a complementarității" (B). În acest mod, se conferă funcție de anticorp cu specificitatea dorită fără riscul eliminării moleculei din cauza faptului că are altă structură izotipică (după Man Sung Co și C. Queen).



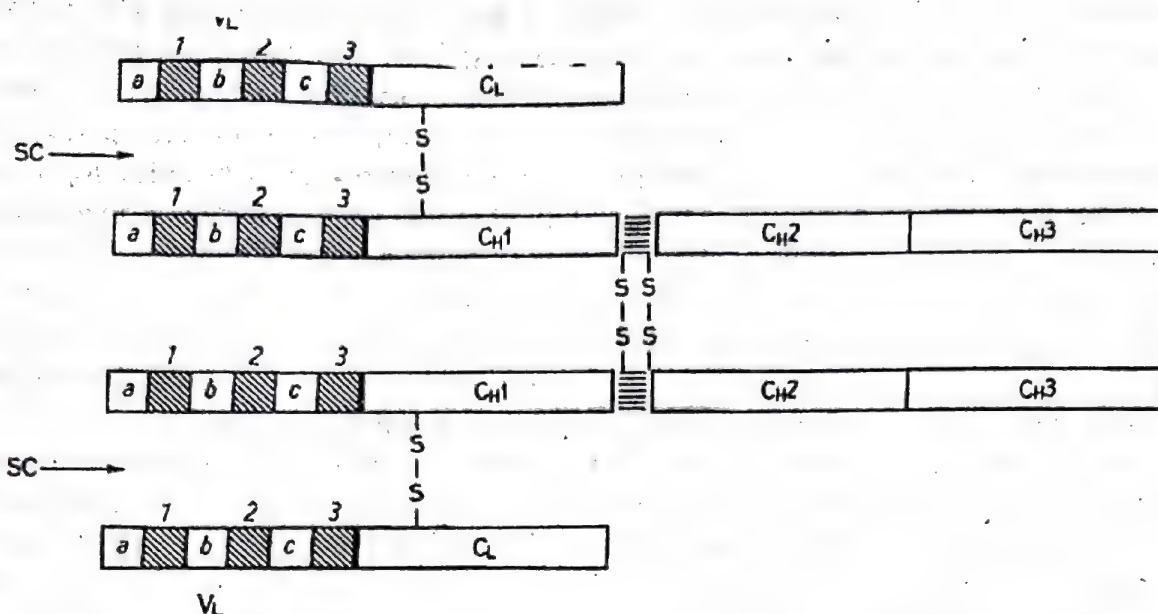


Fig.82: Anticorpi monoclonali "umanizați" (Vezi varianta "B" de la fig. 81). Sunt reținute în moleculă numai regiunile CDR de origine murină, restul moleculei fiind de origine umană (după G. Winter și W.J. Harris).

Există speranța că, prin tehnologia ADN recombinat, în viitorul apropiat va fi posibilă obținerea de anticorpi monoclonali cu molecule aparținând în totalitate specificității izotipice umane.

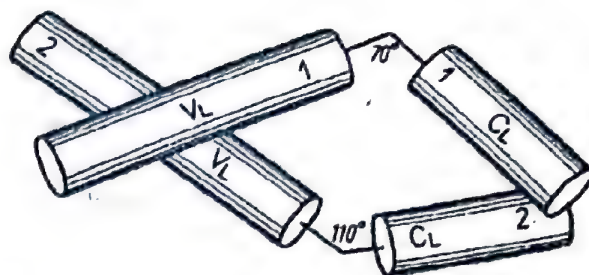
În prezent, sunt probleme legate nu numai de xenogenitatea lor, dar și de preț, de modul corect de stabilire a dozei terapeutice optime, de gradul lor de citotoxicitate, de prezența accidentală a unor virusuri etc. Cu toate aceste dificultăți, anticorpii monoclonali au intrat în uz, nu numai în scop de cercetare sau de diagnostic, dar și în scop terapeutic. Sunt tot mai mult utilizați în terapia unor boli infecțioase (anti-virus herpetic, virusul Rous etc.), a unor boli autoimune (anticorpi anti-CD3, CD4, ICAM-1, LFA-1, anti-CD25 etc.) sau neoplazice (anti-CEA, CDw52 etc.), perspectiva extinderii utilizării lor fiind certă.

**Imunoglobuline omogene patologice.** În multe cazuri de afecțiuni limfoproliferative pot să apară în circulație cantități mari de lanțuri L sau H incomplete, sau unite în fragmente anormale, similare prin modul lor de sinteză proteinelor mielom. Dintre acestea, mai cunoscute sunt proteinele Bence-Jones și fragmentele de lanțuri  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\mu$  identificate în sângele sau urina pacienților cu mieloame sau mieloame maligne.

– **Proteinele Bence-Jones**, cunoscute încă din secolul trecut, sunt dimeri de lanțuri  $L_k$  sau  $L_\lambda$  cu greutatea moleculară 15 000, eliminate în urina bolnavilor cu mielom sau macroglobulinemie, care precipită la 50-60°C în pH acid (4-6), se redizolvă prin încălzire la 80-90°C și reprecipită prin răcire. Sunt proteine omogene, sintetizate de către limfocite maligne aparținând unei singure clone. Lanțurile sunt fie  $k$  fie  $\lambda$ , în dimerul format un lanț  $L$  jucând rolul lanțului H, iar celălalt lanț  $L$ , rolul lanțului L din fragmentele Fab normale (fig. 83).

Diferențele majore în conformația celor două monomere L se manifestă în relația spațială între domeniile C și V, un monomer având unghiul cu o deschidere de 70°, iar celălalt, cu deschidere de 110°. În Fab normal, unghiul format de către  $V_H$  și  $C_H$  este de 80-85°, iar cel format de către  $C_L - V_L$  de 100-110°. Deci, lanțul L(1) este similar lanțului H din Fab normal, iar lanțul L(2), lanțului L. Segmentele

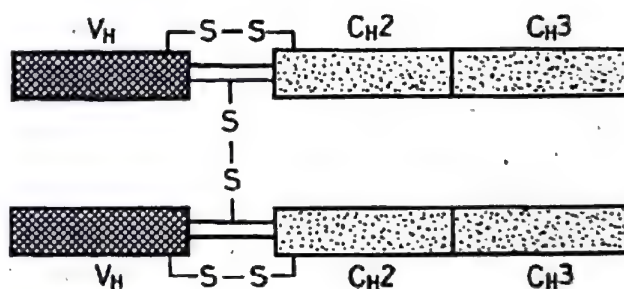
Fig.83. Molecula de proteină Bence-Jones. Lanțul L (1) ar avea rolul lanțului H din molecula normală de imunoglobulină, un pseudofragment Fab fiind format de  $V_L$  al lanțului 1 și  $V_L$  al lanțului 2.



hipervariabile formează o cavitate lungă de 15Å și largă de 20Å care ar reprezenta situsul combinativ, molecula având activitate de anticorp față de unele componente tisulare. Leagă moleculele mici de dimensiunile haptanelor, prin situsuri comparabile ca mărime și poziție cu situsul pentru fosforilcolină al Fab normal de șoarece. Dimerul Bence-Jones ar fi o imunoglobulină primitivă, cu o funcție biologică, respectiv specificitate de anticorp necunoscută.

– **Lanțuri grele patologice.** În unele situații, sinteza lanțurilor H ale moleculelor de Ig se face incomplet, cu "pauze" în secvența normală a aminoacizilor. După înșiruirea primilor 12 - 20 de aminoacizi dinspre extremitatea  $NH_2$  terminală a regiunii  $V_H$ , urmează înșiruirea resturilor din domeniile  $C_{H2}$  și  $C_{H3}$ , regiunea  $V_H$  legându-se direct prin "balama" de aceste domenii datorită inexistenței domeniului  $C_{H1}$ . Au fost identificate lanțuri patologice  $\delta$  și  $\alpha$  în limfomul malign al intestinului subțire la om, sau  $\mu$  în unele stări patologice asociate și cu sinteza proteinelor Bence-Jones. De regulă însă, la acești bolnavi, sinteza lanțurilor L este abolită, legăturile disulfidice intercatenare H - L stabilindu-se între cele două fragmente ale lanțului patologic (fig. 84) care are greutatea moleculară de cca. 40 kD în loc de greutatea normală de 52 kD.

Fig.84. Lanțuri grele patologice. Sunt lipsite de domeniile  $C_{H1}$ , domeniile  $C_{H2}$  legându-se direct la cele  $V_H$ . Din această cauză lanțurile sunt rigide, iar moleculele formate sunt nefuncționale.



## SINTEZA IMUNOGLOBULINELOR

Ca orice moleculă de proteină din organism, imunoglobulinele sunt sintetizate sub control genetic strict, anabolismul lor având caracteristici particulare. După ce își exercită funcțiile biologice, moleculele "îmbătrânesc" și sunt degradate, fiind înlocuite cu altele tinere. Anabolismul și catabolismul Ig sunt procese interdependente care realizează menținerea homeostaziei în apărarea imună mediată umoral a organismului.

**Anabolismul moleculelor de anticorp.** După cum aminteam în capitolele precedente, sinteza imunoglobulinelor recunoaște următoarele etape:

- Sinteza lanțurilor polipeptidice;
- Asamblarea moleculei;
- Adiția componentelor glucidice;



d. Polimerizarea și eliminarea moleculelor de imunoglobulină;

e. Comutarea sintezei moleculelor de imunoglobulină.

Toate aceste procese sunt sub controlul genetic, atât din punct de vedere al sintezei lanțurilor, cât și din cel al asamblării moleculelor.

**Controlul genetic al sintezei imunoglobulinelor** (Vezi capitolul "Determinismul genetic al funcțiilor imune").

**Catabolismul imunoglobulinelor.** Degradarea moleculelor de Ig, sau catabolizarea lor, exprimată ca "timp de înjumătățire" ( $T_{1/2}$ ) este un proces fiziologic care permite înlocuirea permanentă a moleculelor îmbătrânite cu altele tinere, cu menținerea unui nivel constant al lor în organism. Există o relație direct proporțională între rata de catabolizare ( $K$ ), concentrația de Ig ( $A$ ) și timpul ( $T$ )

exprimat în zile, relația fiind  $K = \frac{A}{T}$ , în care  $K$  este rata de catabolizare într-o singură zi. Deci  $T_{1/2}$  este cu atât mai lung cu cât rata sa de catabolizare este mai mică.

Dar, în afară de rata de catabolizare,  $T_{1/2}$  mai este dependent și de clasa de Ig, de specia animală, de viteza de sinteză a moleculelor, respectiv de nivelul concentrației lor în ser etc. Pentru determinarea valorii acestui timp, moleculele sunt marcate radioactiv, de regulă cu  $^{125}\text{I}$ , după care se urmărește prezența izotopului în organism. Așa s-a determinat că, la om,  $T_{1/2}$  al IgM este de 5,1 zile, iar al IgG de 22 de zile. La șoarece, animal cu greutate corporală mică și activitate metabolică intensă,  $T_{1/2}$  al IgG este de numai 3,9 zile în timp ce, la animale cu greutate corporală mare, valoarea lui este mult mai mare. La hipergammaglobulinici, deci în exces de molecule de imunoglobuline,  $T_{1/2}$  scade la jumătate față de valoarea normală (cca. 12 zile), iar la hipogammaglobulinici, crește de aproximativ trei ori față de normal (cca. 70 de zile).

Catabolizarea claselor IgM și IgA nu este influențată de concentrația lor în ser. Mecanismele care stau la baza catabolizării moleculelor de Ig nu sunt bine cunoscute, fapt pentru care au fost emise diferite ipoteze prin care se încearcă explicarea lor. O ipoteză, a "catabolizării selective", susține că molecula de Ig, atunci când îmbătrânește, își modifică conformația devenind străină de organism. Acesta are preformați anticorpi care recunosc moleculele modificate, se combină cu ele, formând complexe care sunt fagocitate și eliminate din organism de către celulele din seria fagocitar-macrofagică.

O altă ipoteză, a "receptorilor de protecție", susține că celulele din seria monocitară, sau unele celule epiteliale care catabolizează Ig au receptori de membrană pentru Fc. Celulele pot lega moleculele din ser fie direct, fie prin intermediul acestor receptori. Moleculele fixate la receptori sunt trecute prin filtrul celular și eliminate extracelular fără a fi distruse de către celule. Moleculele nefixate, odată ajunse în celulă, în lipsa protecției pe care o conferă receptorii, sunt atacate de către "protein-disulfid-reductază", o enzimă care desface legăturile din lanțurile H sau dintre H și L. Lanțurile, odată eliberate, devin susceptibile la acțiunea catepsinelor, care le vor descompune în continuare până la nivel de aminoacizi. Deoarece numărul receptorilor de pe suprafața membranei macrofagelor este fix, și numărul moleculelor care pot fi protejate se menține constant, rata de catabolizare devine cu atât mai mare cu cât crește concentrația acestora în ser. În această situație, un număr sporit de molecule nu mai găsesc receptori liberi, din care cauză se atașează direct la membrana celulară.

Situsul de catabolizare a moleculelor de Ig, deci locul de la nivelul moleculei care face ca ea să fie recunoscută de către elementele de degradare ale organismului atunci când îmbătrânește, este situat la nivelul domeniului C<sub>H2</sub>. Într-adevăr, rata de catabolizare a acestui domeniu este identică ratei de



catabolizare a moleculei întregi, dar este diferită de cea a domeniului  $C_{H3}$  sau a fragmentului *Fab*. Acest situs este diferit de cel care determină legarea la suprafața celulei, el fiind doar "punctul sensibil" al moleculei, la care se atașează enzima "protein-disulfid-reductază" care, odată activată, începe desfacerea ei. Locul de catabolizare a moleculelor în organism este incert. Se pare că un rol important din acest punct de vedere revine ficatului și intestinului subțire, iar în cazul proteinelor Bence-Jones, rinichiului.

**Aplicațiile practice ale anticorpilor.** Poate că prima aplicare practică a anticorpilor s-a făcut cu mult înainte de a se cunoaște structura sau proprietățile biologice și funcționale ale imunoglobulinelor. Transferul pasiv de ser imun sau hiperimun în sistem xenogen a permis, fără prea multe cunoștințe de biochimie și imunochimie, lupta împotriva unor boli infecțioase cu evoluție acută. Seroterapia în difterie, tetanos, scarlatină sau rabie a salvat multe vieți omenești, fapt care a făcut ca obținerea de seruri imune sau hiperimune să devină o preocupare majoră pentru institutele de seruri și vaccinuri din întreaga lume. În prezent însă, pe lângă utilizarea acestor seruri polivalente și xenogene ca mijloace terapeutice care încă nu și-au pierdut total importanța, anticorpilor sunt folosiți într-o varietate largă de tehnici și metodologii de diagnostic imunologic. Fiecare utilizare depinde în ultimă instanță de existența unei surse acceptabile de producere a lor. La început, producția "industrială" s-a făcut folosind cai, oi, iepuri, ca animale de elecție pentru imunizări, care furnizau anticorpi policlonali ce prezentau însă unele neajunsuri, în sensul că aveau variabilitate de specificitate, conțineau și alte proteine în afară de imunoglobuline și erau imunogeni în cazul administrărilor *in vivo* la om. Acest fapt a impus găsirea altor metode, dintre care cea a anticorpilor monoclonali s-a dovedit a fi cea mai adecvată atât scopurilor terapeutice cât și celor de diagnostic sau cercetare fundamentală.

Anticorpilor se folosesc în scop de diagnostic și cercetare într-o varietate de tehnici din ce în ce mai rafinate și mai complexe. Este cazul tehnicilor de radioimunodozare, de imunoradiometrie, de dozări enzimatică (ELISA) etc. De asemenea, cu ajutorul lor se poate realiza, prin cromatografie de afinitate, purificarea proteinelor sau analiza peptidelor prin metoda "fazei reverse directe".

Sunt utilizați pentru identificarea unor substanțe prezente în ser sau urină, pentru detoxifierea organismului de astfel de substanțe, ca de pildă pentru eliminarea digoxinei în caz de intoxicații cu acest medicament, pentru terapia de urgență a unor infecții grave, cu forme de bacteriemie sau septicemie, situații în care se inoculează fragmentele  $F(ab')_2$  direct intravenos etc.

Există speranța utilizării anticorpilor anti-idiotip  $A_2$  ca antigene lipsite de inconvenientele antigenelor naturale, precum și pentru utilizarea anticorpilor monoclonali ca "purători" de agenți distructivi pentru celula canceroasă.

## SISTEMUL COMPLEMENT

Complementul sau alexina este un sistem de factori cu multiple funcții biologice (tabelul 47) care se găsesc într-o concentrație relativ constantă în serul normal. Nivelul seric al acestor factori nu este influențat de stimulii antigenici și de gradul de activare a componentelor celulare ale sistemului imun, dar este influențat de carențele alimentare, în special de cele proteice și de specia animalului. Serul normal de șoarece, de exemplu, are puțin complement, în timp ce în serul de cobai, iepure, nură etc. se găsesc cantități mari. Șoarecele este defectiv în componenta  $C_5$  a complementului, iar porcul are mari cantități din componenta  $C_3$ .



Unele funcții biologice ale complementului

Funcții	Modul de exprimare a funcției
De apărare nespecifică	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Liza bacteriilor sau virusurilor</li> <li>- Liza celulelor străine</li> <li>- Activarea opsonică a fagocitozei (prin receptorii pentru complement)</li> <li>- Activarea chemotactismului neutrofilelor și macrofagelor</li> <li>- Fixarea complexelor antigen-anticorp la membrana unor celule</li> <li>- Activarea degranulării mastocitelor și bazofilelor</li> </ul>
Alte implicații fiziologice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Creșterea permeabilității vasculare</li> <li>- Contractia mușchilor netezi</li> </ul>

### FUNCȚIA CITOLITICĂ A COMPLEMENTULUI

Întregul sistem este alcătuit din cca. 26 de componente organizate în 9 grupe, care în ser se găsesc în stare inactivă, dar pot fi activate enzimatic de către complexe antigen-anticorp ("calea clasică") sau de către diferiți alți factori cum ar fi moleculele mari, imunoglobulinele polimerizate, endotoxinele și lipopolizaharizii germenilor Gram-negativi, pereții levurilor (zimozan) etc. ("calea alternativă"). Activarea pe "cale clasică" este rapidă și eficientă, în timp ce activarea pe "cale alternativă" sau "properdinică" este mai lentă și mai puțin eficientă. Activarea "clasică" este expresia unor mecanisme specifice, pe când cea "alternativă" este o activare primitivă, nespecifică, căreia, la vertebratele inferioare în special, îi revine un rol major în apărarea antibacteriană. Și una și alta din aceste căi duc la liza celulelor străine, eukariote sau prokariote, ca urmare a disocierii lipidelor din membrană, cu alterarea ireversibilă a acesteia. Primul component, odată activat, declanșează o reacție în "cascadă" inducând activarea următorului component și așa mai departe, în succesiunea C 1 - C 4 - C 2 - C 3 - C 5 - C 6 - C 7 - C 8 - C 9.

Componentele sunt numerotate în ordinea activării lor, cu excepția C 4 care, deși este pe locul doi în secvența de activare, are numărul 4 deoarece a fost descoperit și descris după componentele C 2 și C 3. Prin consens s-a convenit ca o linie neîntreruptă deasupra simbolurilor să semnifice activarea fragmentelor, iar literele după numere să semnifice formarea de fragmente ca urmare a scindării moleculelor inactivate. De exemplu, C 3 este scindat în C 3a (inactiv) și C 3b (activ enzimatic).

Componentele complementului sunt sintetizate atât de către macrofage și monocite, care se pare că le folosesc pentru "uz propriu", cât și de celulele hepatice, ca excepția C 1, care ar fi sintetizată la nivelul epiteliului gastrointestinal și urogenital.

Din punct de vedere funcțional, moleculele complementului pot fi împărțite în trei grupe: două realizează cascada de reacții care vor activa C 3 (o grupă pentru calea clasică și alta pentru cea alternativă) pentru ca, odată activată componenta

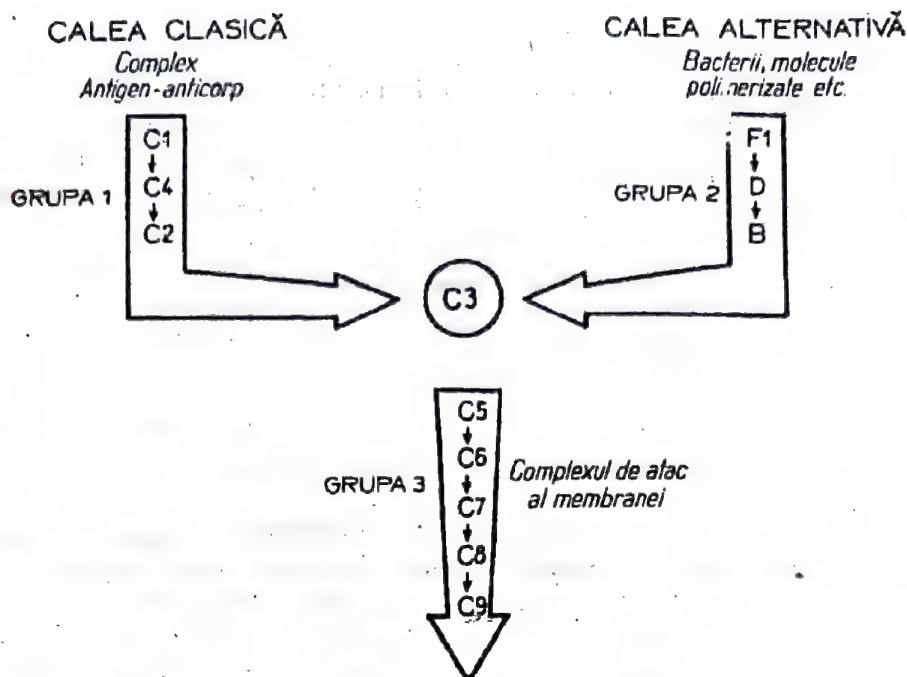


Fig.85. Secvențele de activare a complementului prin căile "clasică" și "alternativă". Ambele căi duc la activarea componentei C3 și la antrenarea complexului de atac C5-C9.

C3, să activeze la rândul ei moleculele celei de a treia grupe care vor realiza parte finală a funcțiilor citolitice formând "complexul de atac" al membranei celulare (fig. 85).

În mod normal, componentele complementului se găsesc sub formă de precursori inactivi care însă, după clivaj proteolitic limitat, se desfac în două sau mai multe fragmente active, dintre care un fragment minor, care de regulă nu este implicat în procesul de citoliză și un fragment major implicat în acest proces. Fragmentul major poartă două situsuri: unul pentru atașarea la membrana celulară și altul pentru activarea enzimatică necesară clivării următorului component din secvența de activare (fig. 86). O parte din fragmentul major activat, cu funcții

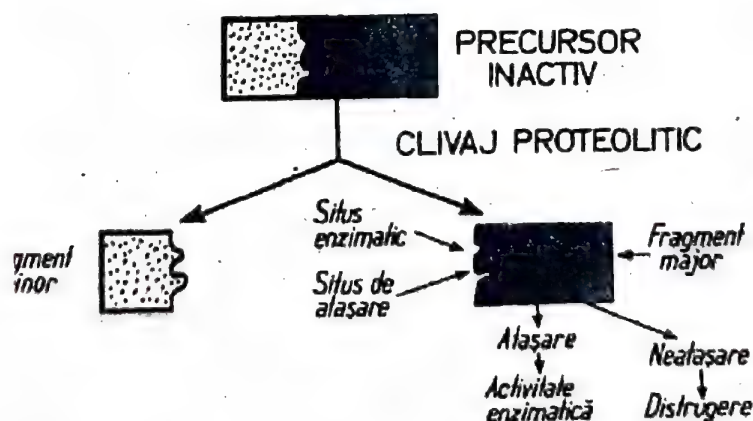


Fig.86. Principiul de bază al clivării componentelor complementului. Sub acțiunea proteolitică a unor enzime, precursorul inactiv este clivat în două fragmente: unul minor, cu activități biologice diferite, dar fără activitate enzimatică, și cel major, cu activitate enzimatică și cu posibilități de atașare la pereții celulelor străine. Dacă nu s-a atașat este complet distrus, iar dacă s-a atașat își desfășoară activitatea enzimatică, activând un alt component existent până acum ca precursor inactiv (după M. Haeney).



enzimatice, se leagă la celulă și devine activator pentru secvențele ulterioare, pe când o altă parte, nelegată la peretele celular, este foarte rapid distrusă. În acest fel, este evitată generarea unor acțiuni nocive pentru organismul propriu.

În ambele căi, secvența evenimentelor se desfășoară în trei etape diferite, și anume: 1) recunoașterea sau declanșarea secvenței de inițiere; 2) activarea enzimatică și asamblarea complexelor de atac și 3) formarea moleculei "ucigașe" cu perforarea membranei celulei țintă.

**Calea clasică de activare a complementului.** Moleculele de imunoglobulină, după ce au fixat antigenul, suferă modificări conformaționale care "descoperă" situsul de legare a complementului de la nivelul domeniului C<sub>H2</sub> al moleculei de IgG sau domeniului C<sub>H4</sub> al moleculei de IgM, permițând recunoașterea de către acestea a complexului C<sub>1</sub> și activarea cascadei de reacții care vor sfârși prin a liza membrana celulară. Nu toate moleculele de Ig pot activa complementul după ce au format complexe cu anticorpii, unele fiind inerte din acest punct de vedere (tabelul 48). Situsul pentru complement de pe molecula de Ig odată descoperit, leagă fragmentul C<sub>1q</sub> din complexul proteic C<sub>1</sub>. Acesta este format din trei subunități în formă de Y, fiecare subunitate fiind la rândul ei alcătuită din două părți, în compoziția fiecăreia dintre ele fiind trei lanțuri peptidice legate între ele prin legături disulfidice. Tot complexul, format din 18 lanțuri, are aspectul unui buchet de lălele (fig. 87). Extremitatea globulară, rezistentă la colagenază se leagă la situsul pentru complement de pe molecula de Ig, tija sensibilă la colagenază, în prezența Ca<sup>2+</sup> activează C<sub>1s</sub> și C<sub>1r</sub>, iar porțiunea dintre tijă și lanțul globular este un triplu helix de unire.

Tabelul 48

Principalele clase și subclase de imunoglobuline care pot lega eficient fragmentul C<sub>1q</sub> al complementului

Specia	Clasa sau subclasa de imunoglobuline
Om	IgG1, IgG3, IgG2, IgM
Șoarece	IgG2a, IgM
Cobai	IgG2, IgM
Porc	IgG2, IgM
Rumegătoare	IgG1

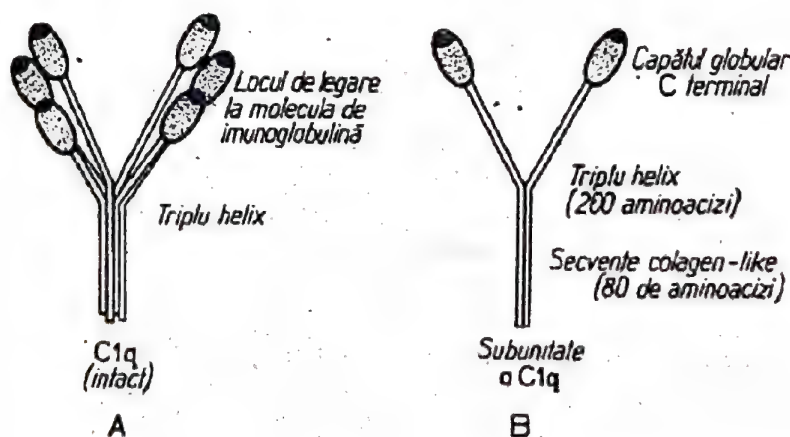


Fig.87. Aspectul fragmentului C<sub>1q</sub> intact (A) și al unei subunități componente ale sale (B) (după I. Roitt și col.)

Pentru legarea C 1q sunt necesare două situsuri, respectiv două fragmente *Fc* situate la o distanță foarte apropiată (fig. 88). Din această cauză, complementul poate fi activat de către o singură moleculă de IgM care are înmănunchiate 5 fragmente *Fc*, dar nu și de o singură moleculă IgG cu un fragment *Fc* unic.

După activare, C 1r și C 1s sunt convertite în enzime proteolitice care vor hidroliza componentele C 4 și C 2. Fragmentul C 1s scindează componenta C 4 într-un peptid minor, cu greutatea moleculară de 600 D, fragmentul C 4a și un fragment major, C 4b. C 4b are afinitate pentru C 2 care este apoi scindat în fragmentele C 2a cu greutatea moleculară mică și C 2b. Fragmentul C 2b în prezența  $Mg^{2+}$  se leagă la fragmentul C 4b, formând complexul C 4b2b sau "convertaza clasică C 3", cu timpul de înjumătățire de 5 minute la 37°C. Convertaza C 4b2b taie la capătul  $NH_2$  terminal al lanțului componentei C 3 un fragment peptidic C 3a alcătuit din 37 de resturi de aminoacizi cu greutatea moleculară de cca. 9 000 D. Aminoacidul ultim de la extremitatea  $COOH$  terminală a fragmentului C 3a este arginina. În afară de fragmentul C 3a, inactiv enzimatic, dar cu marcante proprietăți anafilactice, proteoliza convertazei C 3 mai formează un fragment mai mare, C 3b, care se leagă la convertaza C 4b2b formând complexul C 4b2b3b sau "convertaza clasică C 5" care va desface componenta C 5 în fragmentele C 5a și C 5b. Fragmentul C 5a, cu 74 de resturi de aminoacizi și, de asemenea, un rest de arginină la extremitatea  $COOH$  terminală, ca și C 3a, nu are funcții citolitice dar acționează în reacțiile inflamatorii, fiind deci o "anafilotoxină" (cu o activitate mai slabă decât cea a fragmentului C 3a). Celălalt fragment, C 5b, se atașează la membrana celulei țintă, antrenând adiția secvențială a altor patru proteine - componentele 6, 7, 8 și 9 - care, în raport molar direct și corect, formează "complexul de atac al moleculei". Odată componentul C 5 clivat, celelalte secvențe de atac se declanșează automat, fără alte activări enzimatică. Complexul C 5b6b este hidrofil dar, atunci când leagă și componenta C 7, devine hidrofil și hidrofob cu exprimarea unor grupe apolare care-i conferă proprietăți de "detergent", solubilizator al lipidelor de membrană. În soluție, complexul C 5b6b7 are o existență foarte scurtă cu un timp de înjumătățire de cca. 0,1 secunde. Dar, odată legat la membrană, devine stabil, polimerizează C 8 și apoi C 9 care vor forma "instrumentele" de perforare ireversibilă a membranei. Sistemul complement, odată activat, continuă secvențele activatoare sub regim automat până la con-

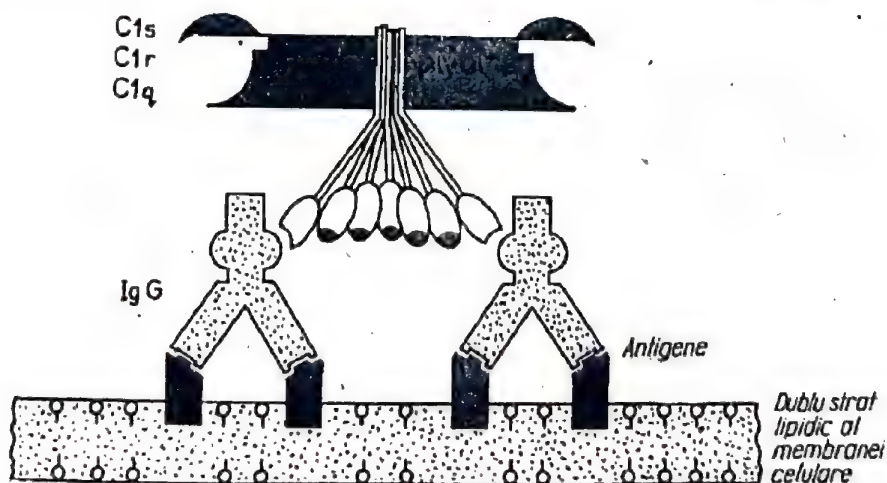


Fig.88. Modul de ataşare a componentei C1q la moleculele de IgG fixate specific pe membrana plasmatică a unei celule. Pentru ca C1q să fie activat, este necesară prezenţa a două fragmente Fc apropiate (după I. Roitt şi col.).



sumarea totală a componentelor sau fragmentelor sale, consumare care, de altfel, reprezintă și una din modalitățile de control și "frânare" a acestor funcții. Activarea însă mai poate fi inhibată nu numai prin "epuizarea" fragmentelor datorită vieții lor scurte, dar și de intervenția unor alți factori. Este cazul "inhibitorului C 1", o esterază care blochează declanșarea activării încă de la nivelul complexului C 1. Inhibitorul se leagă la C 1q eliminând fragmentele C 1r și C 1s sub formă de complexe C 1r - C 1s, blocând în acest mod posibilitatea activării componentelor C 4 și C 2.

Un alt control este exercitat de către un factor inhibitor, denumit "factorul I". Acesta acționează asupra fragmentului C 3b care scindează în continuare în fragmentele C 3c și C 3d. Fragmentul C 3c este eliminat, iar C 3d rămâne atașat la C 3b limitându-i activitatea enzimatică.

**Calea alternativă de activare a complementului.** Factorii de declanșare a cascadei evenimentelor activatoare ale componentelor complementului și secvența de inițiere a lor pe cale clasică sunt deci complexul antigen-anticorp și complexul C 1 - C 4 - C 2. În cazul căii alternative, aceștia sunt înlocuiți de proteine polimerizate, de endotoxine și de factorul de inițiere "FI". Acest factor activează o glicoproteină (factorul B) care competiționează cu un alt factor, factorul H, pentru ocuparea unui situs comun pe fragmentul C 3b (tabelul 49). Odată B activat, se formează complexul C 3bB, care sub acțiunea enzimatică a unei globuline (factorul D) și în prezența  $Mg^{2+}$  pierde un fragment mic Ba, fragmentul mare rămânând atașat la C 3b. Se formează complexul C3bBb (sau "convertaza solubilă C 3") care va activa componenta C 5 cu formarea complexului de atac, într-o manieră similară convertazei C 3 (C 4b2b) din calea clasică (fig 89). Polizaharizii, endotoxinele, pereții levurilor etc., odată ajunse în ser, activează conversia componentei C 3 în fragment C 3b, care se va fixa la suprafața polimerului activator și va atașa cantități tot mai mari de factor B, care devine sensibil la acțiunea proteolitică a factorului D cu eliberarea de fragmente Ba și Bb. Fragmentele mici Ba se pierd, iar cele Bb vor forma cu C 3b complexe C 3bBb instabile, complexe care se stabilizează prin captarea properdinei.

Tabelul 49

Unele proprietăți fizico-chimice ale factorilor intervin în activarea pe "cale alternativă" a complementului

Factorul	Greutate moleculară	Concentrația în ser (mg/litru)	Modul de alcătuire a moleculei	Clivează în
FI (factor de inițiere)	170	?	Pseudoglobulină formată din două lanțuri polipeptidice	
B	93	200	$\beta$ 1-glicoproteină	- Ba, o $\alpha$ 2-globulină de 30 kD - Bb, o $\gamma$ -globulină de 63 kD cu afinitate pentru C3
D	24	1 - 5	$\alpha$ - globulină formată dintr-un singur lanț	
Properdina	223	25	Tetramer format din două unități complexe	

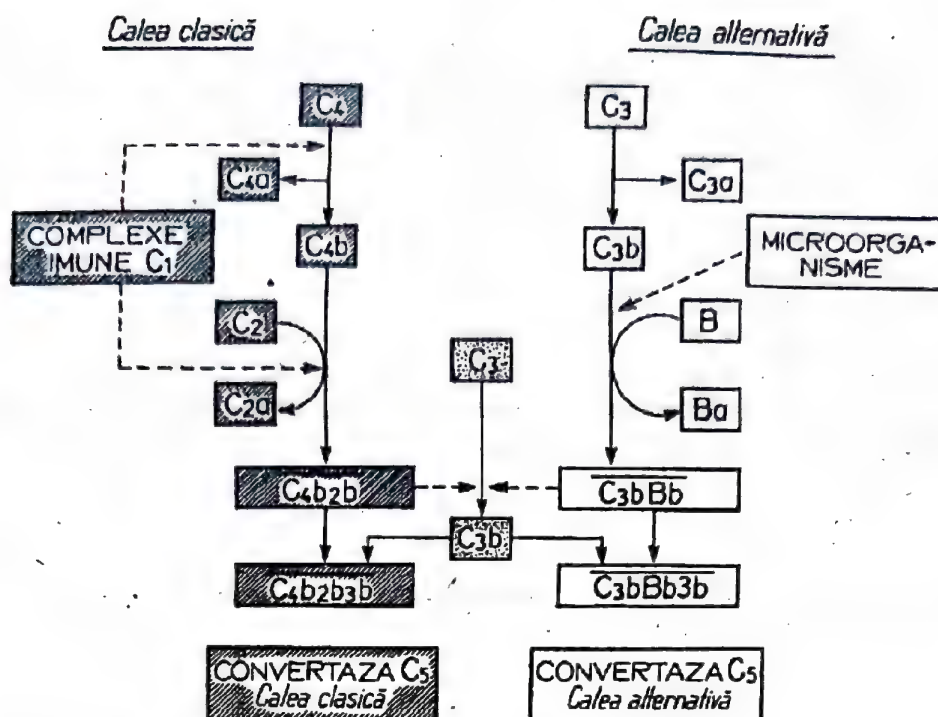


Fig.89. Analogia între "calea clasică" și "calea alternativă" de activare a complementului. Ambele generează convertaza C3 (C4b2b pe cale clasică și C3bBb pe cale alternativă). În calea clasică fragmentul C3b este obținut prin scindarea componentei C3, pe când calea alternativă folosește C3b preformat (după I. Roitt și col.).

Se formează "convertaza fixă" sau "properdin-dependentă" a căii alternative. Evenimentele se amplifică progresiv, cu activarea complexului de atac care va liza membrana bacteriilor sau celulelor eukariote. Procesul reactiv se stinge ca urmare a intervenției a cel puțin trei factori majori, și anume: a) eliminarea bacteriilor sau celulelor străine, urmată de scăderea din ser a moleculelor polimerizate sau endotoxinelor și, deci, diminuarea conversiei C 3 în C 3b; b) degradarea fragmentului Bb și c) intervenția competitivă a factorului H care va forma complexul inactiv C 3bH, complex ce va înlocui fragmentul Bb din convertaza C 3bBb

#### ALTE FUNCȚII BIOLOGICE ALE COMPLEMENTULUI

În afară de funcția citotoxică, complementul mai produce mediatori ai inflamației și anafilaxiei, factori chemotactici, opsonizanți etc. (tabelul 50). De exemplu, fragmentul C 3a (anafilatoxina, eliberat ca rezultat al acțiunii convertazei C 3 asupra componentului C 3), se leagă la receptorii de pe mastocite și bazofile, legare urmată de eliberarea de histamină și alți mediatori ai anafilaxiei.



Unele proprietăți biologice ale componentelor complementului (după M. Haeney)

Componentul	Greutatea moleculei (kD)	Concentrația în ser ( $\mu\text{g/ml}$ )	Numărul polipeptidelor	Funcții
C 1q	410	150	18	Neutralizarea virusurilor
C 1r	83	50	1	Inițierea lizei virale
C 1s	833	50	1	
C 2	115	25	1	Creșterea permeabilității vasculare
C 3a C 3b	180	1200	2	Anafilatoxină imună, chemotaxie, aderență imună, opsonizare, mobilizarea leucocitelor din măduvă
C 4	210	550	3	Aderență imună, inițierea lizei virale
C 5a C 5b	180	70	2	Anafilatoxină, chemotaxie, inițierea lizei, degranularea mastocitelor
C 6	130	60	1	Liză celulară
C 7	120	50	1	
C 8	155	55	3	
C 9	75	60	1	

Punctul nodal al declanșării activității biologice a complementului este activarea C3 și formarea C3b, deoarece multe celule au receptori pentru acest fragment la care aderă. O parte din fragmentul C 3b se atașează la C 4b2b formând convertaza C5(C4b2b3b) iar restul fragmentului, neadiționat, se fixează la membrana celulelor țintă sau pe complexe antigen-anticorp, fiind recunoscut de receptorii pentru C3b de la nivelul membranei granulocitelor PMN, eozinofilelor, macrofagelor, monocitelor etc. Acestea vor fagocita mai eficient celulele străine sau complexe antigen-anticorp (opsonizare) deoarece în acest proces, pe lângă receptorii pentru fragmentul Fc de pe membrana celulelor respective, sunt antrenati și receptorii pentru C3b. Componenta C3 amplifică și citotoxicitatea mediată celular anticorp-dependentă (ADCC), datorită punților pe care le formează între celula țintă și cea citotoxică. Fragmentul C 5a, cu greutatea moleculară de cca. 11 kD, eliberat în cursul activării complementului ca rezultat al acțiunii C 4b2b3b, este chemotactic pentru celulele fagocitare, activând deplasarea lor către locul unde este prezent agresorul. De altfel, funcții similare au și fragmentul C3a și complexul C5b6b. Fragmentul C5a activează fagocitoza și eliberarea de oxigen toxic de către neutrofile, cu amplificarea posibilităților de distrugere a materialului fagocitat, provoacă degranularea mastocitelor și bazofilelor, eliberarea de leukotriene de către PMN, crește permeabilitatea vaselor, contracția mușchilor netezi etc. Faptul că depleția în componentele C 5 - C 9 induce lipsa sintezei de anticorpi din clasa IgG, dar nu și a celor din clasa IgM, a dus la concluzia că aceste componente contribuie la formarea celulelor de memorie față de antigenele timodependente inoculate pe cale intravenoasă,

prezența lor favorizând fixarea antigenului pe celulele dendritice din centrul germinativ și stimularea celulelor B. S-a dovedit că fragmentele C3b și chiar C3d pot controla evoluția limfocitelor B spre faza S (de sinteză a imunoglobulinelor) precum și proliferarea limfocitelor T h care au fixat IL-2 la receptorii de membrană.

Pacienții cu leucemie limfatică cronică (LLC) au alterate funcțiile complementului datorită unor inhibitori ai componentelor C1r și C1s din care cauză au dereglată activitatea bactericidă serică.

Sinteza proteinelor complementului este reglată de către citokine, anticorpi, histamine etc. De pildă,  $IFN\alpha$  stimulează secreția componentei C2, IL-1 și IL-6 sinteza C3 etc. Receptorul pentru histamină de tip I ( $H_1R$ ) stimulează, iar cel de tip II ( $H_2R$ ) inhibă formarea componentelor complementului etc., toate acestea dovedind existența unor complexe mecanisme de reglare și autocontrol la nivel celular și molecular între diferitele compartimente ale sistemului imun.

## LIMFOKINELE ȘI MONOKINELE

Interleukinele (IL), interferonii (IF), factorul de necroză a tumorilor (TNF) și diverși factori de creștere alcătuiesc marea familie a *citokinelor*, mediatori solubili antigen-nespecfici secretați de diferite populații celulare cu rol biologic complex atât în cadrul sistemului imun, cât și în cadrul altor organe și sisteme. Sinteza lor este sub controlul unor gene situate la nivelul unor cromozomi diferiți (tabelul 51).

În linii generale, citokinele secretate de către limfocite se numesc *limfokine*, iar cele secretate de către monocite-macrofage, *monokine*. Desigur, aceste denumiri diferite sunt relative, deoarece unele molecule pot fi secretate atât de către limfocite cât și de monocite. Citokinele acționează prin intermediul receptorilor celulari activând sau inhibând funcțiile celulei respective. În mod normal, concentrația lor în ser este extrem de mică, de pe o parte datorită sintezei menținute la un nivel scăzut atunci când celulele sunt nestimulate, iar pe de altă parte, datorită rapidei inactivări și eliminări din circulație. Progresele mari realizate în clonarea ADN, în purificarea și caracterizarea lor, au făcut posibile atât obținerea de citokine în cantități mari, de ordinul miligramelor, cât și dobândirea de informații exacte privind structura chimică și unele funcții biologice, în special cele privitoare la rolul lor reglator în creșterea și maturarea celulară.

Tabelul 51

Localizarea genelor unor citokine umane la nivel cromozomial

Produsul codificat de gene	Termen prescurtat	Gena localizată pe cromozomul
Interleukina 1 $\alpha$	IL-1 $\alpha$	2
Receptorul pentru interleukina 1 $\alpha$	IL-1 $\alpha$ R	
Interleukina - 2	IL - 2	4
Interleukina - 8	IL - 8	



Produsul codificat de gene	Termen prescurtat	Gena localizată pe cromozomul
Factorul de stimulare a coloniilor de macrofage	M - CSF	5
Factorul de stimulare a coloniilor de granulocite și macrofage	GM - CSF	
Interleukina - 3	IL - 3	
Interleukina - 4	IL - 4	
Interleukina - 5	IL - 5	
Interleukina - 9	IL - 9	
Factorul de necroză a tumorilor $\alpha$	TNF - $\alpha$	6
Factorul de necroză a tumorilor $\beta$	TNF $\beta$	
Interleukina - 6	IL - 6	7
Interleukina - 7	IL - 7	8
Interferonul $\alpha$	IFN $\alpha$	9
Interferonul $\beta$	IFN $\beta$	
Factorul de stimulare a coloniilor de granulocite	G - CSF	17
Interleukina - 11	IL - 11	19
Factorul de creștere a timocitelor	TGF	

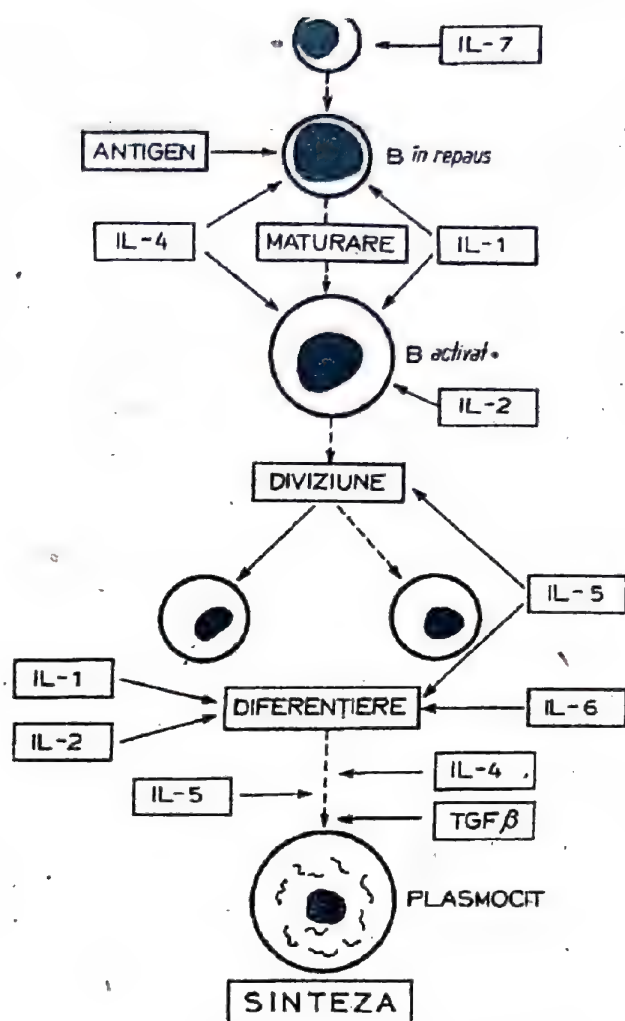
Caracterele lor generale sunt următoarele: a) greutate moleculară mică (<80 kD); b) moleculele sunt de regulă glicozilate; c) acționează în manieră "autocrină" sau "paracrină"; d) interacționează cu receptori de mare afinitate, reglând transcrierea unor gene prin semnale secundare. Multe sunt implicate în reglarea proliferării și diferențierii limfocitelor B (fig. 90). Se cunosc peste 20 de proteine încadrate în această familie, dar multe activități ale acestora se suprapun.

## INTERLEUKINELE

Termenul a fost adoptat pentru prima dată la cel de al II-lea Colocviu Internațional asupra limfokinelor din anul 1979, din Elveția. Sunt polipeptide produse de leucocite și alte celule, cu rol de "hormoni ai sistemului imun", extrem de potente și acționând asupra unor ținte multiple. Sunt implicate în reacțiile imune specifice și în procesele inflamatorii, fiind cunoscute până în prezent 13 specii moleculare diferite, dintre care mai bine studiate sunt doar 8 (tabelul 52).

**Interleukina 1** este o glicoproteină transmembranară a cărei existență a fost semnalată în anul 1972, când s-a constatat că supernatantul celulelor mononucleare de om, șoarece, iepure etc. activate cu endotoxinele germenilor Gram-negativi potențează răspunsul limfocitelor T stimulate *in vitro* cu lectine. De aici concluzia că macrofagele, pe lângă funcția lor fagocitară, sunt și celule secretoare cu rol în stimularea altor populații celulare. Prima denumire a acestor molecule a fost LAF (lymphocyte activating factor=factorul de activare a limfocitelor) iar ulterior, tot pe baze funcționale, a primit o mulțime de alte denumiri (tabelul 53). Molecula, cu greutate de 17,5 kD, este rezistentă la temperatura de 56°C și la pH 2-9, dar sensibilă la acțiunea pronazei, chemotripsinei și tripsinei.

Fig.90. Intervențiile unor interleukine în maturarea și diferențierea limfocitelor B.



Tabelul 52

Unele caracteristici biochimice și funcționale ale interleukinelor umane mai bine cunoscute

Interleukina	Denumiri anterioare	Greutate moleculară	Sursa	Efecte biologice
IL - 1	LAF	IL - 1 $\alpha$ 15 - 17 kD	- Monocite macrofage - Celule dendritice	- Eliberarea de limfokine din celulele T activate - Diferențierea, activarea și proliferarea celulelor B, multiplicarea fibroblastelor, celulelor endoteliale
		IL - 1 $\beta$ 15 - 17 kD	- Celule NK, B, T, endoteliale, fibroblaste, eritrocite, etc.	- Stimulează producția de proteine S, collagenaze, PGE <sub>2</sub> - Provoacă somn, febră, activează chemotactismul PMN - Intervine în inflamații



Interleukina	Denumiri anterioare	Greutate moleculară	Sursa	Efecte biologice
IL - 2	TCGF	15 kD	- Limfocite <i>T</i> activate	- Proliferarea celulelor <i>T</i> - Proliferarea și diferențierea limfocitelor <i>B</i> - Creșterea activității citotoxice a limfocitelor <i>T</i> , <i>NK</i> , <i>K</i> , monocitelor
IL - 3	20 $\alpha$ SDH	14,3 kD	- Limfocite stimulate cu lectine, clone de <i>T</i> activate	- Stimulează creșterea celulelor foarte tinere, progenitoare ale seriilor eritroide, mieloide, megakariocitare etc. - Activează sinteza IL - 4 și IL - 6
IL - 4	BSF - 1 BCGF - I	15 - 20 kD	- Limfocite <i>T</i> activate	- Stimulează proliferarea limfocitelor <i>T</i> , <i>B</i> , sinteza de IgE, eliberarea receptorului <i>Fc<math>\epsilon</math></i> de la nivelul limfocitelor <i>B</i> - Acționează sinergic cu IL - 3 în cursul diferențierii mastocitelor și bazofilelor
IL - 5	BCGF - II	48 kD	- Celule <i>T</i>	- Induce diferențierea eozinofilelor - Stimulează sinteza IgM și IgA
IL - 6	BCDF BSF - 2 IF - b2	26 kD	- Monocite, limfocite <i>T</i> , - fibroblaste, celule tumorale	- Induce exprimarea antigenelor MHC pe fibroblaste - Activează sinteza proteinei S de către hepatocite - Stimulează proliferarea și diferențierea limfocitelor <i>B</i>
IL - 7		14,9 kD	- Celulele stromale din timus și măduvă	- Acționează asupra precursorilor limfocitelor <i>B</i>
IL - 8			- Monocite, celule endoteliale	- Stimulează degranularea bazofilelor și mastocitelor - Chemotactice pentru PMN

BSF=B stimulating factor; BCGF=B cell growth factor; BCDF=B cell differentiating factor.

Tabelul 53

#### Denumiri diferite ale interleukinei-1

Denumirea	Simbolul
Lymphocyte activating factor (factor de activare a limfocitelor)	LAF
B cell activating factor (factor de activare a limfocitelor <i>B</i> )	BAF
Epidermal thymocyte activating factor (factor de activare a timocitelor epiteliale)	ETAF
Leukocytic endogenous mediator (mediator endogen leucocitar)	LEM
Mononuclear cell factor (factorul celular mononuclear)	MCF
Hepatocyte stimulating factor (factorul de stimulare a hepatocitelor)	HSF
Synovial factor (factorul sinovial)	SF

Molecula are în compoziția sa cca. 30% hidrați de carbon și se găsește sub două forme care, deși derivă din gene diferite, se leagă la același receptor: IL-1 $\alpha$  cu 159 de reziduuri de aminoacizi și IL-1 $\beta$ , o proteină globulară stabilă cu 153 de reziduuri. Majoritatea moleculelor IL-1 $\alpha$  rămân stocate în celulă, fără să mai ajungă în circulație, fiind active numai în cazul contactului celulă-celulă. Moleculele IL-1 $\beta$  sunt eliberate extracelular sub formă de precursori cu greutate moleculară mare (36 kD) și clivate de proteaze în molecule de 17 kD.

Molecula primordială mare este lipsită de aminoacizi hidrofili numiți "peptide semnal" care opresc clivarea proteinei native în molecule "mature" de 17-22 kD. Din cauza lipsei unei peptide semnal, IL-1 $\alpha$  rămâne la nivelul membranei.

Asupra moleculei native de IL-1 $\beta$ , cu greutatea moleculară de 31 kD, acționează o protează specifică (enzima convertitoare IL - 1 $\beta$ ) care o scindează în forme active, cu greutatea moleculară de 17,5 kD și îi facilitează exocitoza. Timpul de înjumătățire *in vivo* este de 2-3 minute. Este larg răspândită în natură, fiind prezentă la artropode, urocordate, moluște, echinoderme (steaua de mare), amfibii, pești, păsări, mamifere, fapt care dovedește vechimea și perfectă ei conservare de-a lungul evoluției filogenetice. La om, sinteza ei scade o dată cu vârsta, sinteză realizată de numeroase tipuri de celule aflate sub acțiunea unor inductori dependenți sau independenți de antigen (tabelele 54 și 55). Din prima categorie fac parte contactele intercelulare realizate de moleculele de adeziune după stimulul antigenic, citokinele eliberate de limfocitele T activate, IL-1 exogenă etc. În a doua categorie intervin unele iritații celulare provocate de virusuri, bacterii, silicați, urați sau alte citokine cum ar fi TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF etc.

Tabelul 54

## Celule care pot sintetiza IL-1

Originea celulelor	Celulele sau organul în care se găsesc ele	Tipuri celulare care secretă IL - 1
Granulocitară, mieloïdă limfoidă	- Monocite	
	- Macrofage	- alveolare, peritoneale, sinoviale, Langerhans
	- Celule dendritice	-
	- Limfocite	- Th, B, LAK, NK (LGL)
	- Granulocite	- neutrofile, eozinofile
Diversă	- Vase	- endoteliale
	- Creier	- astrocite, microglij
	- Piele	- keratinocite
	- Alte celule	- renale, meningiale, fibroblaste, condrocite, epiteliale, timice, celule osoase, hepatice, foliculare din tiroidă, Sertoli (din testicul) etc.



## Inductori ai sintezei IL - 1

Originea inductorilor	Inductori
Microorganisme și unele substanțe produse de către acestea	- LPS, MDP, exotoxina stafilococică, PPD, toxina holerică, exotoxina <i>Ps.aeruginosa</i> , mycoplasmele, spirochetele, <i>Candida albicans</i> , virusul herpetic, HIV
Limfokine și alți mediatori solubili	- Factorul de stimulare a coloniilor (CSF), interferonii, factorii de necroză a tumorilor, IL - 2, IL - 6, componentele complementului (C3a, C3b, C5a), vasopresina
Diferite produse biologice sau chimice	- Hormonii steroizi, hidrocortizonul, proteina C reactivă, bradikina, tuftsina, complexe imune, polimixina B, colchicina - Zimozan, forbol miristat acetat (PMA), vitamina A, vitamina D3, radicalii de oxigen toxic

Sinteza este inhibată sau diminuată de către prostaglandine ( $PGE_2$ ), interferoni ( $IFN\gamma$ ), infecții cu virusul imunodeficienței dobândite (HIV), virusul coriomeningitei, virusul Epstein-Barr (EBV) corticoizi, IL-4, IL-6, IL-10, histamine, lactoferină, ciclosporina A etc.

*In vivo*, IL-1 acționează asupra sistemului imun, circulației sangvine, sistemului nervos central, stimulând sau depresând unele funcții ale acestora (tabelul 56). În linii mari, această limfokină stimulează *in vivo* proliferarea celulară, favorizează producerea febrei, a somnului, are activitate antitumorală, este implicată în procesele inflamatorii, în controlul hematopoiezei unde acționează ca un cofactor etc. La nivel celular, activează exprimarea moleculelor de adeziune, activează GTP care, prin proteinele G, activează diferite enzime inclusiv un factor nuclear (NF- $\kappa$ B) stimulator pentru limfocitele B. Secvența fenomenelor ar fi următoarea:



Tabelul 56

## Funcții activatoare sau inhibitoare ale IL-1

Stimulează	Deprimă
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Somnul de "undă lentă"</li> <li>- Producerea de hormoni (ACTH) și citokine (G-CSF, GM-CSF)</li> <li>- Sinteza anticorpilor</li> <li>- Sinteza unor citokine</li> <li>- Funcțiile fagocitare</li> <li>- Chimiotactismul</li> <li>- Hematopoieza</li> <li>- Protecția contra irradiațiilor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pofta de mâncare</li> <li>- Activitatea plasminogenului</li> <li>- Presiunea venoasă</li> <li>- pH-ul sangvin</li> <li>- Sinteza albuminei</li> <li>- Concentrația <math>Zn^{2+}</math> și <math>Fe^{2+}</math></li> <li>- Sinteza lipoproteinelor</li> <li>- Sinteza acizilor grași liberi</li> </ul>

Stimulează	Deprimă
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aderența leucocitelor la peretele vascular</li> <li>- Sinteza proteinelor de "fază acută"</li> <li>- Sinteza componentelor complementului</li> <li>- Sinteza corticosteroizilor</li> <li>- Sinteza proteinelor hepatice</li> <li>- Eliminarea <math>\text{Na}^+</math></li> <li>- Proliferarea limfocitelor T, B, fibroblastelor, keratinocitelor, celulelor sinoviale, mezangiale, gliale</li> <li>- Eliberarea proteoglicanilor din cartilaje</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adsorbția intestinală a lipidelor</li> <li>- Proliferarea celulelor endoteliale</li> </ul>

Odată fixată la receptorul de pe membrana plasmatică a celulelor, IL-1 declanșează transmiterea intracelulară a diferitelor semnale ca : activarea proteinkinazelor, creșterea pragului intracelular al cAMP care activează NF-kB ce se fixează la ADN, activarea PLC legată la fosfatidil-etanol-amină, a calmodulinei, precum și exprimarea genelor c-fos, c-myc, c-jun etc. Nivelul concentrației în umori sau al sintezei IL-1 este diferit în unele stări patologice. În unele boli, sinteza este crescută, în timp ce în altele, este foarte scăzută (tabelul 57).

În spondilita ankilozantă și în lepră, sinteza IL-1 este nemodificată.

Datele obținute *in vitro* nu coincid total cu cele *in vivo*, unde sunt interacții inevitabile cu alte citokine, și unde supresia sau amplificarea funcțiilor unor citokine de către alte citokine este o formă de reglare biologică foarte complexă.

Tabelul 57

#### Nivelul sintezei IL-1 în unele stări patologice

Sinteză crescută în	Sinteză scăzută în
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tuberculoză</li> <li>- Ulcer duodenal</li> <li>- Septicemii</li> <li>- Glomerulonefrite</li> <li>- Artrită reumatoidă</li> <li>- Sarcoidoză pulmonară</li> <li>- Fibroză pulmonară</li> <li>- Pneumoconioze</li> <li>- Ciroză hepatică</li> <li>- Sclerodermie sistemică</li> <li>- Diabet insulino-dependent</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cancer hepatic, uterin, ovarian</li> <li>- Infecții acute</li> <li>- Malnutriție</li> <li>- Psoriazis</li> <li>- Scleroză în plăci</li> <li>- LES (lupus eritematos sistemic)</li> <li>- Vârsta înaintată</li> </ul>



**Interleukina-2 (IL-2)** este un factor solubil produs de către limfocitele *T* stimulate cu antigene, aloantigene sau mitogene. Molecula are greutate de 15 kD cu 133 reziduuri de aminoacizi. Sinteza acestei glicoproteine cu rol de "hormon imunologic" este sub controlul unei gene localizate pe cromozomul 4 și este asociată cu exprimarea concomitentă a receptorului pentru ea (IL-2R) pe suprafața membranei plasmactice a celulei care o sintetizează. Activitatea de sinteză are loc în primele 4 ore după stimulul antigenic, continuă ascendent până în ziua a 3-a, după care începe un declin cu încetarea sintezei la 5-8 zile de la stimul. Pentru a o reactiva, și în felul acesta a activa exprimarea IL-2R, este necesar un nou stimul antigenic și un co-stimul generat de regulă de către IL-1. Sinteza maximă a IL-2 ar avea loc între 2-5 zile, cu implicarea unor enzime și metaboliți ai inozitolfosfatului în interdependență cu nivelul citoplasmatic al  $\text{Ca}^{2+}$ . Este inhibată de către ciclofosfamidă, cortizon, ciclosporina A, fosfolipaza A<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub> etc., și activată de IL-1, IFN, GM-CSF și alte citokine. În afară de limfocitul *Th* ( $\text{CD4}^+$ ) care este principalul ei producător, IL-2 este sintetizată în cantități mici și de limfocitele *T* supresoare / citotoxice ( $\text{CD8}^+$ ) și poate și de cele *NK*.

Molecula are o structură de  $\alpha$  helix cu lanțul primar încolăcit și răsucit în structurile finale sub formă globulară cu aspect de Y. De fapt sunt 6 helixuri dintre care trei (A,B,C) ar fi implicate în legarea ei la receptori, legare care se face la lanțul  $\alpha$  (p55), în care prezența rezidului Arg ar avea un anumit rol. A fost obținută prin "inginerie genetică" (rIL-2) cu cADN transferat la *Escherichia coli*, dar molecula recombinată (rIL-2) se deosebește de cea naturală prin înlocuirea în poziția 125 a radicalului Cys cu reziduul Ser.

Interleukina-2 este un factor care stimulează proliferarea și diferențierea limfocitelor *T*, a unor celule *B* normale sau leucemice și a unor precursori *NK*. Timocitele imature transcriu gena IL-2 care împreună cu cea IL-4 joacă un rol esențial în dezvoltarea ontogenică a acestora, servind ca factori autocrini de creștere a precursorilor *T*. Această limfokină este profund implicată în dezvoltarea celulelor pre-*T* și diferențierea populațiilor *Th* ( $\text{CD4}^+$ ) și *T* s/c ( $\text{CD8}^+$ ). La șoarece, acționează în circulația periferică autocrin, stimulând diferențierea celulelor *T* h1 (de tip "inflamator") și *T* h2 (de tip "ajutător"). Există un oarecare paralelism între IL-2 și IL-4 în privința acțiunilor lor asupra diferitelor stadii de maturare *T*.

La nivelul intracelular, activează sinteza ARN a receptorilor pentru transferină, a genei c-myc, iar în cazul monocitelor stimulează producerea de IFN $\gamma$ , IL-1, TNF. Accidental se poate instala un deficit de sinteză a IL-2 sau de exprimare a receptorilor pentru IL-2. Deficitul, întâlnit în boala Hodgkin, în LES (lupusul eritematos sistemic), lepră, AIDS, poate fi corectat prin administrarea de IL-2 exogenă. Dacă însă deficitul este la nivelul exprimării receptorilor, atunci adăugarea de IL-2 singură este inoperantă. Administrarea ei în asociere cu timozina (fracțiunea  $\alpha$ ) și timozina  $\alpha$  1 sau alți hormoni timici ar putea fi o sursă de corectare a acestui deficit.

A fost încercată utilizarea IL-2 în clinică, sperându-se că prin activarea specifică a limfocitelor *T* *in vitro*, sau a celulelor LAK, se va putea obține liza tumorii *in vivo*. Până în prezent însă, rezultatele sunt neconcludente, la unii pacienți înregistrându-se chiar efecte toxice, manifestate clinic prin hipertensiune arterială, infarct miocardic, insuficiență respiratorie, edeme, hemoragii gastro-intestinale, modificări psihice etc.

**Interleukina-3 (IL-3)** este un factor de creștere hematopoietic produs la 12-20 de ore după activarea limfocitelor *T* de către antigen, mitogene sau anticorpi anti-receptori. Inițial a fost definită ca un factor care ar putea induce exprimarea



enzimei 20  $\alpha$ -hidroxisteroid dehidrogenază (20  $\alpha$  SDH) de către limfocitele splenice ale șoarecilor atimici (*Nu / Nu*). Intervine direct ca reglator asupra creșterii precursorilor multipli hematopoietici angajați timpuriu ca progenitori ai granulocitelor, bazofilelor, eozinofilelor, macrofagelor sau mastocitelor. Excepție fac celulele din seria eritroidă și megakariocitară, asupra cărora IL-3 nu poate exercita controlul în vederea maturării lor decât în prezența eritropoietinei, respectiv a trombopoietinei. Stimularea hematopoiezei de către IL-3 este amplificată prin intervenția altor citokine cum ar fi IL-1, IL-6, GM-CSF etc. Poate regla atât proliferarea monocitelor și macrofagelor, cât și adeziunea acestora la endoteliu sau funcția lor de prezentare a antigenului limfocitelor T. De asemenea, se pare că poate potența răspunsul inflamator indus de către endotoxinele germenilor Gram-negativi.

Structura chimică a moleculei, a cărei sinteză este inhibată de către ciclosporina A, a putut fi precizată după clonarea ADN, gena care-i controlează sinteza fiind situată la om pe cromozomul 5. Curios, IL-3 murină este mai apropiată ca structură și secvență a reziduurilor de aminoacizi de cea umană decât de cea de șobolan, care este o specie mult mai apropiată din punct de vedere filogenetic decât omul. Molecula este o glicoproteină cu greutatea de 23-28 kD la șoarece și 14,6 kD la om, și cu 30-40% hidrați de carbon dintre care cca. 12% sunt reprezentați de glucozamină. Are două reziduuri Cys, existând probabil posibilitatea realizării unor legături disulfidice între pozițiile 43 și 106. Reziduurile Pro și Leu din secvența moleculei au un rol critic în modularea funcțiilor biologice ale acestei limfokine.

IL-3 se leagă la receptorul ei cu afinitate mică sau mare, inducând fosforilarea tirozinei. Este activă în concentrații mici (cca. 0,2 ng / ml) exercitând diverse activități biologice, toate asociate proceselor de proliferare și diferențiere a progenitorilor imaturi, printre care, proliferarea coloniilor celulare, producerea de histamină, activarea unor enzime etc.

Receptorul pentru IL-3 are un domeniu extracelular cu 417 reziduuri legate printr-un domeniu transmembranar. În ciuda lungimii sale, domeniul citoplasmic nu are activitate kinazică. Receptorul de mare afinitate este un complex multi-proteic la care probabil sunt atașate și alte lanțuri accesorii.

Dereglarea în controlul hematopoiezei în relație cu IL-3 este unul dintre principalele mecanisme potențiale care duc la leucemii. Aceste dereglări ar consta din exprimarea anormală a genei care-i controlează sinteza, din exprimarea anormală a receptorilor pentru ea sau pentru alți factori de creștere, sau din ambele cauze. În urma acestor evenimente, progenitorul scapă de sub control și deviază spre proliferare anarhică.

**Interleukina-4 (IL-4)** a fost descrisă inițial ca "factorul de creștere a celulelor B murine" (BCGF) și apoi ca un factor pleiotropic cu efecte multiple asupra diferitelor celule. Este o glicoproteină moleculară de 20 kD, secretată de către limfocitele Th, mastocite, bazofile și fibroblastele stromei măduvei osoase. Secreția IL-4 este o formă de răspuns al celulelor care au fixat alergenul la anticorpii IgE fixați citofil, acționând ca un factor autocrin pentru aceste celule. Nivelul său în lichidele biologice ale subiecților normali sau cu diferite boli este extrem de scăzut, fiind probabil sub 20 pg / ml.

A fost obținută inițial din supernatantul de cultură a liniei de celule din timomul EL-4 stimulat cu PMA (forbol miristat acetat), din mediul de cultură a unor limfocite T activate prin stimul lectinic sau antigenic și, ulterior, prin izolarea ADN recombinat (cADN) care codifică sinteza ei sau a receptorilor ei. IFN- $\gamma$  inhibă sinteza IL-4. Se leagă cu mare afinitate la un receptor monomer de tip imunoglobulinic cu



greutatea moleculară de 130 kD și cu un domeniu extracelular format din 207 reziduuri de aminoacizi, unul transmembranar de 24 reziduuri și unul lung, citoplasmic, de 569 reziduuri. Domeniul extracelular este foarte asemănător cu cel al IL-2R al receptorului pentru IL-3, al lanțurilor  $\alpha$  și  $\beta$  al IL-6R, al GM-CSF R, IL-7R și al receptorului pentru eritropoietină. Este relativ modest exprimat pe celulele *T* și *B* în repaus sau activate, pe timocite, o celulă având cam 100-1000 de receptori pe suprafața ei.

Mult timp s-a considerat că această limfokină acționează în exclusivitate asupra limfocitelor *B*, influențându-le exprimarea antigenelor MHC de clasa II, a IgG1 și IgE pe membrană, precum și evoluția rapidă spre faza S. Ulterior însă, s-a dovedit că are un spectru larg de acțiuni, exercitând activități reglatoare nu numai asupra unor funcții imune, ci și asupra hematopoiezei (fig. 91). Stimulează multiplicarea celulelor *T* normale, proliferarea *in vitro* a unor linii stabilizate *T*, acționează sinergic cu factorul de stimulare a coloniilor (CSF) cu efect stimulator asupra promonocitelor, megakariocitelor, precursorilor granulocitari, eritrocitari etc. Merită subliniat faptul că mecanismele de activare a limfocitelor *B* umane de către IL-4 sunt diferite de cele de la șoarece. La om, activarea *B* necesită hidroliza PIP<sub>2</sub> în IP<sub>3</sub> și o creștere a concentrației Ca<sup>2+</sup> citosolic urmată de creșterea nivelului cAMP și exprimarea receptorilor IgM pe membrană. La șoarece, IL-4 nu induce astfel de modificări. Această limfokină are rol important în reglarea sintezei IgE, inhibă sinteza TNF și a IL-1, IFN $\gamma$  este antagonistul ei. Acționează asupra unor tipuri diferite de celule, în diferite stadii de diferențiere, efectul ei depinzând atât de tipul de celulă asupra căreia acționează, cât și de prezența altor citokine în mediu. La rândul ei, modulează producerea de citokine de către celulele *T*, *B*, NK, macrofage și fibroblaste. Datorită acestor proprietăți imunomodulatoare, acționează ca agent anti-tumoral și inflamator, antrenând în acest scop, celulele *T* c, macrofagele și eozinofilele.

**Interleukina-5 (IL-5).** La începutul anilor 1970 s-a observat că supernatantul culturilor de splenocite murine stimula proliferarea eozinofilelor. În anul 1985, un grup de cercetători japonezi izolează, din mediul de cultură al unui hibridom de limfocite *T*, un factor care activa sinteza și secreția IgM de către celulele *B* murine

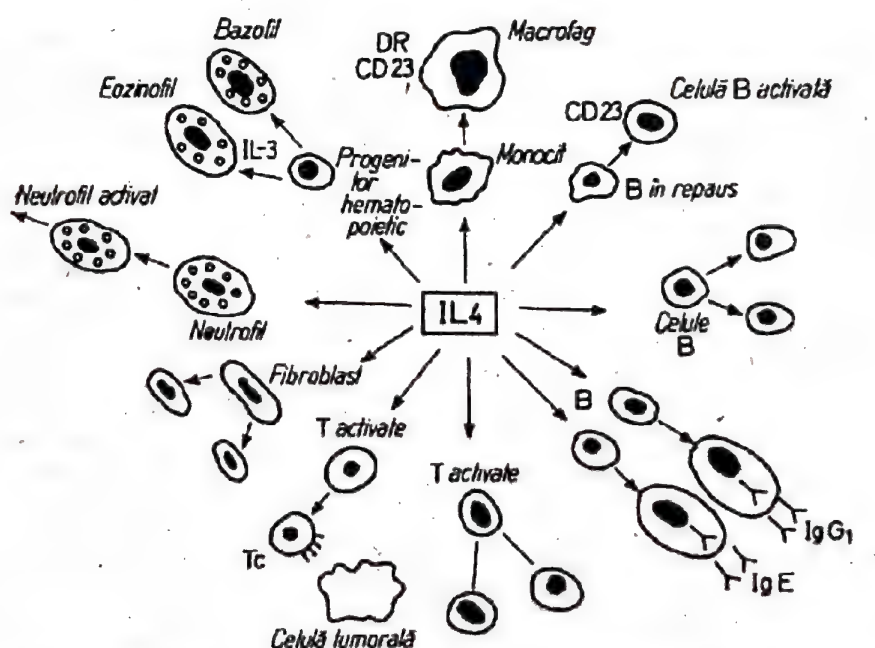


Fig.91. Diferiți precursori celulari și celule mature funcțional asupra cărora acționează IL-4.

stimulate antigenic primar. Până atunci, factorii secretați de către limfocitele *T* cu efect activator asupra celor *B* sau asupra eozinofilelor aveau diferite denumiri (TRF, BCGF-II, EDF; T-replacing factor; B-cell growth factor-II; eosinophil differentiation factor). Prin clonarea moleculelor de ADN care codificau pentru TRF, s-a stabilit că, de fapt, responsabilă atât pentru activitatea TRF cât și pentru cea a BCGF-II sau EDF este o singură moleculă, care a fost denumită IL-5. La șoarece, ea este produsă de către limfocitele *T*, fiind o glicoproteină cu greutatea moleculară situată între 32 și 60 kD. Atât la om cât și la șoarece acționează ca un factor de diferențiere a eozinofilelor. La șoarece, dar nu și la om, ar acționa și ca factor de creștere a limfocitelor *B*.

Molecula matură are cel puțin două reziduuri Cys implicate în dimerizarea ei și formarea de homodimeri prin legături disulfidice, condiție esențială pentru conferirea activităților biologice. Receptorul pentru IL-5, o proteină cu greutate moleculară de cca. 48 kD, este exprimat în exclusivitate pe limfocitele *B* activate și pe eozinofile, exprimarea fiind puternic stimulată de către LPS. Acționează sinergic cu IL-1 pentru inducerea sintezei de IgM și cu IL-4 pentru sinteza IgG1. În afară de acțiunea asupra limfocitului *B*, IL-5 stimulează exprimarea receptorilor pentru IL-2 la nivelul membranei limfocitelor *T*, influențând atât funcțiile citotoxice ale acestora cât și cooperările celulare în răspunsul imun. De asemenea, este un factor de stimulare a eozinofilelor contribuind la proliferarea și diferențierea lor, la menținerea viabilității și la mobilizarea lor spre locul unde este prezent parazitul, amplificând răspunsul alergic. Nu acționează asupra precursorilor hematopoietici ci asupra celulelor activate de IL-3 în asociere cu G-CSF, rolul lor în generarea eozinofilelor fiind din acest punct de vedere analog eritropoietinei.

În afară de acțiunea asupra progenitorilor eozinofilici și formarea de colonii, IL-5 activează și funcția citotoxică anticorp-dependentă (ADCC) a acestor celule.

**Interleukina-6 (IL-6)** este o glicoproteină cu greutatea moleculară de cca. 21 kD și cu cca. 184 de reziduuri de aminoacizi, cu două situsuri de N-glicozilare și două punți disulfidice între reziduurile Cys 46-Cys 52 și Cys 55-Cys 85.

Este produsă de către o mare varietate de celule ca: monocite, macrofage, limfocite *T* și *B* activate, mastocite, fibroblaste, celule endoteliale, astrocite, celule gliale, keratinocite, celule epiteliale, celule neoplazice etc. și acționează asupra a diferite celule țintă (fig. 92). În afară de G-CSF nu are omologie cu alte citokine, dar ocupă un loc central în rețeaua acestora, fiind influențată de către unele substraturi activate de acestea și influențând la rândul ei activitatea altor mediatori (fig. 93). Acționează pleiotropic asupra unui număr mare de celule și țesuturi, fiind implicată în inducerea diferențierii celulelor *B*, sintezei proteinelor de fază acută de către celulele hepatice, promovarea creșterii celulelor mielom, proliferarea și diferențierea limfocitelor *T*, sinteza IL-2 și exprimarea receptorilor pentru această interleukină etc. Inhibă proliferarea unor linii celulare mieloid, activează maturarea megakariocitelor, formarea de colonii multipotențiale induse

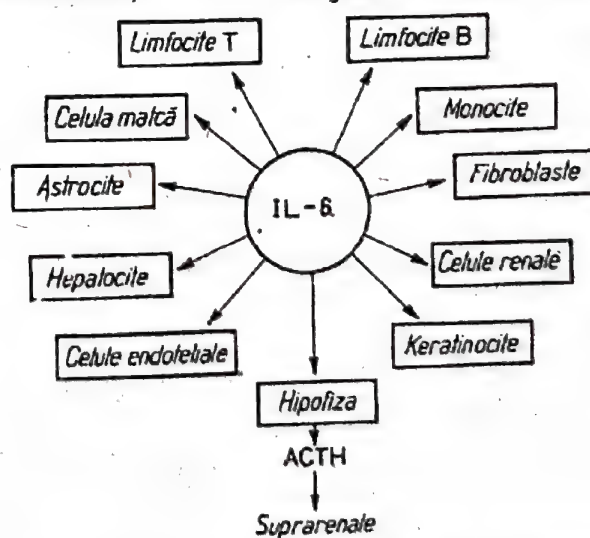


Fig.92. Celule sau organe țintă asupra cărora acționează IL-6.



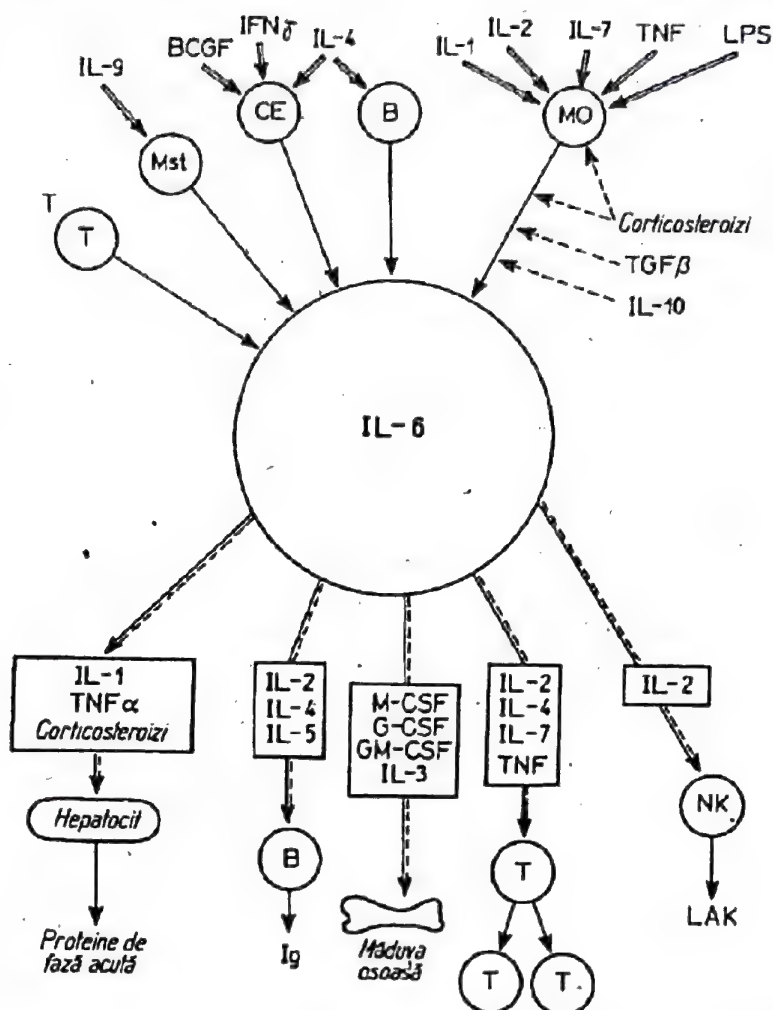


Fig.93. Poziția IL-6 în "orchestra" citokinelor. Această citokină este în relații funcționale cu alte citokine care, la rândul lor, vor influența unele celule sau organe ale sistemului imun.

Mst = mastocit; T, B = limfocite T sau B; MO = măduvă osoasă

⇒ activare în vederea sintezei; → sinteză; ⇌ coactivare; - - → inhibiție.

de către IL-3, creșterea celulelor mezangiale, a keratinocitelor etc. Pe suprafața limfocitelor T în repaus, a celor B lipsite de IgD pe membrană (slgD<sup>+</sup>), pe celulele mielom etc., este exprimat receptorul pentru IL-6, un dimer cu greutatea de 80 kD din familia imunoglobulinelor care, printr-un lanț polipeptidic adiacent la o glicoproteină cu greutatea de 130 kD (gp 130), ar transmite semnale intracelular.

Deci, IL-6 este o citokină cu efecte multiple și care acționează asupra unor ținte diferite (tabelul 58).

Sunt cunoscute mecanismele reglatorii care controlează exprimarea funcțională a genei pentru IL-6 de la nivelul cromozomului 7; un rol critic ar reveni unui factor nuclear (NF-IL-6) care ar recunoaște secvența unui activator viral pentru virusul HIV sau SV40 (virusul simian 40), infecția virală inducând sinteza de IL-6. De aici ideea că infecțiile cronice virale duc la modificări funcționale ale genei IL-6 prin activarea NF-IL-6. Așa se face că această limfokină este implicată în patogeniza unor boli în care nivelul seric al ei este crescut. Este cazul unor anomalii policlonale B, al unor boli autoimune de genul artritelor reumatoide, cirozelor hepatice, al unor boli proliferative ca glomerulonefrita proliferativă mezangială, psoriazis sau al unor neoplazii cu referire specială la plasmacitoame și mieloame, limfoame, leucemii, carcinoame etc.

## Unele activități biologice ale IL - 6

Ținta asupra căreia activează	Acțiunea
Virusuri	- Blocarea multiplicării virionilor
Limfocitele B activate	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stimularea diferențierii celulelor</li> <li>- Activarea sintezei de IgG și IgM</li> <li>- Sinergic cu IL-4 stimulează sinteza de IgE</li> <li>- Sinergic cu IL - 5 stimulează sinteza de IgA</li> <li>- Factor de creștere a limfocitelor B stimulate de virusul Epstein-Barr (EBV)</li> </ul>
Limfocitele T	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Factor de activare a limfocitelor T</li> <li>- Factor de diferențiere a limfocitelor T c</li> <li>- Sinergic cu IL-1, IL-4 și IL-7 este co-stimulator al timocitelor și limfocitelor T</li> </ul>
Celulele NK	- Activarea funcțiilor citotoxice
Macrofage	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stimulează activitatea bactericidă</li> <li>- Modulează exprimarea markerilor de membrană</li> <li>- Induce exprimarea receptorilor pentru IL-4</li> <li>- Induce exprimarea moleculelor de adeziune ICAM-1</li> <li>- Stimulează sinteza IL-1 și TNF</li> </ul>
Hematopoieză	- Cofactor, acționând sinergic cu alte citokine în diferite stadii de diferențiere
Hepatocite	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Factor de stimulare a hepatocitelor (HSF=hepatocyte stimulating factor)</li> <li>- Stimulează producerea de fibrinogen, <math>\alpha</math>1-anti-chemotripsină, <math>\alpha</math>1-antitripsină, componentele C 1, C 3 și B ale complementului</li> <li>- Scade producerea de alfafetoproteină, transferină, albumină</li> </ul>
Keratinocite	- Activează proliferarea
Granulocite PMN	- Le stimulează sinteza de lizozim, lactoferină, 3-glucuronidază
Diverse celule	- Inhibă apoptozisul

De regulă, este o relație directă între gravitatea bolilor respective și nivelul seric al IL-6: cu cât acest nivel este mai mare, cu atât boala este mai gravă, relația fiind, în linii mari, următoarea: activarea genei → sinteza anormală de IL-6 → activarea policlonală (în special a limfocitelor B) → patogeniza unor boli autoimune. Se găsește în multe lichide biologice în cursul diferitelor procese infecțioase și inflamatorii. Este un remarcabil marker de stres, sinteza ei fiind inhibată de IL-4, IL-10 și TGF $\beta$ .



**Interleukina-7 (IL-7)**, descoperită în anul 1988 în supernatantul culturilor de celule de măduvă osoasă, a fost denumită inițial "limfopoietina 1", deoarece acționa ca un factor de creștere a limfocitelor *B* și oarecum și a limfocitelor *T* aflate în stadii timpurii de dezvoltare. Culturile de celule din care a fost izolată constau din două populații diferite: un "pat" de celule de stromă a măduvei osoase, aderate la suprafețele de material plastic, care permite proliferarea în suspensie a celulelor *B* imature. La șoarece, ARNm care transmite informația pentru această interleukină, se găsește în concentrații mari în timus dar nu și în splină sau alte organe.

Celulele stromale eliberează IL-7, o glicoproteină cu greutatea moleculară de 14,9 kD și cu 154 reziduuri de aminoacizi. A fost analizată secvența aminoacidă pentru molecula umană și murină; ambele au conservate câte șase reziduuri de Cys cu duble legături disulfidice intramoleculă, fiind foarte apropiate structural. Au o secvență "leader" de 25 de reziduuri de aminoacizi, urmată de 129 aminoacizi cu două locuri potențiale de glicozilare, unul la nivelul poziției 69 și altul la poziția 70. Interleukina-7 favorizează proliferarea precursorilor limfocitelor *B* care au exprimat intracitoplasmatic și membranar lanțul greu ( $\mu$ ), dar încă nu au exprimat lanțul ușor  $L$  al IgM. De îndată ce precursorul *B* a exprimat pe suprafața membranei molecula completă IgM, interleukina-7 devine inoperantă. De asemenea, intervine în proliferarea limfocitelor *T* imature ( $CD3^+ CD4^- CD8^-$ ), încetându-și influența atunci când devine imunocompetentă ( $CD3^+ CD4^+$ ) sau  $CD3^+ CD8^+$ . Se pare că IL-7 acționează totuși pe limfocitele *T* aflate într-un stadiu mai avansat de maturare, ajutându-le să-și exprime receptorul pentru IL-2, în timp ce pe limfocitele *B* acționează în stadii incipiente de maturare. Activează sinteza de IL-1, IL-6, IL-8, TNF și restabilește nivelele normale ale limfocitelor *T* și *B* la imuno-depresii.

**Interleukina-8 (IL-8)**, sau "proteina activatoare a neutrofilelor", este secretată de către limfocitele *T* stimulate cu mitogene, de către monocitele activate cu citokine, precum și de către fibroblaste sau celule endoteliale. Ar exista două forme moleculare diferite: un polipeptid alcătuit din 72 reziduuri de aminoacizi denumit "ser-IL-8" și altul din 77 de reziduuri, denumit "ala-IL-8" (serică și alanină IL-8) care ar avea la extremitățile  $NH_2$  terminale serina, respectiv alanina. Limfocitele *T* și monocitele eliberează predominant ser-IL-8 pe când celulele endoteliale și fibroblastele sunt o populație moleculară care conține 80% ala-IL-8. Această interleukină este un potent efector al funcțiilor antiinflamatorii, inhibând aderarea PMN la celulele endoteliale activate. *In vivo*, stimulează chemotactismul granulocitelor PMN, infiltrarea lor, degranularea bazofilelor și mastocitelor, eliberarea moleculelor toxice de oxigen, protejează celulele endoteliale de potențialul distructiv al PMN, proces mediat probabil de trombină, crește permeabilitatea vaselor, produce febră etc.

**Interleukina-9 (IL-9)** este sintetizată de către limfocitele *T* și monocite. Molecula are 144 de reziduuri de aminoacizi la care sunt atașate diferite complexe de hidrați de carbon, fapt care generează un anumit grad de eterogenitate a ei sub raportul greutății moleculare (30-40 kD). Exerciță efecte biologice multiple asupra unor ținte diferite (tabelul 59).

Activitatea IL-9 asupra unor celule țintă

Celula țintă	Activitatea
Limfocite T	- Factor de creștere
Mastocite	- Stimulează proliferarea
Timocite fetale	- Activează mitogeneza
Megakariocite	- Activează proliferarea unor linii megakariocitare
Precursori eritrocitari	- Stimulează formarea coloniilor de astfel de precursori

**Interleukina-10 (IL-10)** sau "factor de sinteză și inhibiție a citokinelor", cu greutatea moleculară de 30-40 kD, este sintetizată de către limfocitele murine  $Th_2$  stimulate cu antigene sau ConA, precum și de către limfocitele B normale sau unele limfoame B. Nu este sintetizată de către celulele  $Th_1$ , dar acționează asupra acestora inhibându-le sinteza de IL-2, IL-3, TNF,  $IFN\gamma$ , GM-CSF.

În afară de  $Th_1$ , IL-10 stimulează timocitele în cooperare cu IL-2, IL-4 și IL-7, induce exprimarea antigenelor MHC de clasa II pe membrana limfocitelor B și stimulează, în asociere cu IL-3 și IL-4, proliferarea mastocitelor. Inhibă producerea de către macrofage a IL-1, IL-6, IL-8 și TNF. La om, este produsă de către limfocitele  $Th$  ( $CD4^+$ ) stimulate policlonal sau antigenic.

**Interleukina-11 (IL-11)**, produsă de către celulele stromale, are greutatea moleculară de 22 kD când este neglicozilată și 199 de reziduuri de aminoacizi, în care predomină Pro (174) și lipsește Cys. Molecula umană este activă pentru celulele murine, dar cele murine nu au nici un efect asupra celulelor umane.

Acționează asupra hepatocitelor stimulând sinteza de către acestea a proteinelor de fază acută. De asemenea, activează sinteza de către plasmocitoame a IL-6 și producerea imunoglobulinelor de către plasmocite, acționând sinergic cu IL-3. Stimulează formarea coloniilor megakariocitare și a altor precursori hematopoietici. IL-11, în special atunci când acționează sinergic cu IL-3, are o serie de activități comparabile cu cele ale IL-6 (tabelul 60).

**Interleukina-12 (IL-12)**, denumită și "factor de creștere a celulelor matcă" (SCGF = stem cell growth factor), "factor de creștere a mastocitelor" (MCGF = mast cell growth factor) sau "factorul de stimulare a celulelor NK" (NKSF = NK stimulatory factor), este o moleculă dimer cu greutatea de 15-20 kD și 248 reziduuri de aminoacizi, alcătuită din două lanțuri, p40 și p35, codificate de gene diferite. Lanțul p 35 are omologie cu IL-6 și G-CSF, iar cel p40 este similar receptorului pentru IL-6.

Se găsește legată la membrana celulelor dar și sub formă solubilă. Puternic glicozilată, este produsă de către diferite linii de celule stromale, de fibroblaste, carcinoame hepatocelulare și acționează ca factori de creștere asupra mastocitelor, precursorilor hematopoietici și celulelor NK. Induce sinteza  $IFN\gamma$  de către NK.



Comparație între activitatea IL-6 și cea a IL-11

Activitatea	Sinergism cu IL-3	IL-6	IL-11
Induce proliferarea megakariocitelor	Da	+	+
Maturarea progenitorilor celulari	"	+	+
Stimularea eritropoezei	"	+	+
Producerea de proteine de fază acută	Nu	+	+
Activarea sintezei anticorpilor	"	+	+
Stimularea plasmocitoamelor	"	+	+ -
Activarea limfocitelor T	"	+	-
Producerea febrei	"	+	-

IL-12 produs de către macrofage activează sinteza IFN $\gamma$  și proliferarea limfocitelor T $_{H1}$ . La rândul său, IFN $\gamma$  activează sinteza IL-12, blocând-o pe cea a IL-4 și IL-10, inhibitori ai IL-12.

Recent, a fost semnalată și existența IL-13, IL-14, IL-15.

Deoarece existența acestor molecule cu rol de mediatori imunologici a fost pusă în evidență pe baza proprietăților lor funcționale, era și firesc ca denumirile inițiale să fie făcute ținând cont de aceste proprietăți (tabelul 61).

Tabelul 61

Unele denumiri anterioare ale interleukinelor

Interleukina	Denumirea anterioară	Simbolul
IL-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Factorul de activare a limfocitelor</li> <li>- Pirogenul endogen</li> <li>- Proteina mitogenă</li> <li>- Factorul de înlocuire T-III</li> <li>- Factorul de activare a celulelor B</li> <li>- Factorul de diferențiere a celulelor B</li> <li>- Factorul de activare a osteoclastelor</li> <li>- Mediator leucocitar endogen</li> </ul>	LAF EP MP T-IIIIRF BCAF BCDF OAF ELM
IL-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Factorul de înlocuire a celulelor T</li> <li>- Factorul de mitogeneză pentru limfocite</li> <li>- Factorul de creștere a celulelor T</li> </ul>	TRF TCMF TCGF
IL-3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Factorul de promovare a creșterii</li> <li>- Factorul de activare a mastocitelor</li> <li>- Factorul de stimulare a celulelor producătoare de histamină</li> <li>- Factorul de stimulare a hematopoiezei</li> </ul>	GPM MGF HIF HSF

Interleukina	Denumirea anterioară	Simbolul
IL-4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Factorul de creștere a celulelor <i>B</i> stimulate antigenic</li> <li>- Factorul de stimulare a celulelor <i>B</i></li> <li>- Factorul de creștere a celulelor <i>T</i> 2</li> <li>- Factorul 2 de creștere a mastocitelor</li> </ul>	BCGF-I BSF-1 TCGF-II MCGF-2
IL-5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Factorul de înlocuire a celulei <i>T</i></li> <li>- Factorul 2 de creștere a celulelor <i>B</i> activate</li> <li>- Factorul de diferențiere a eozinofilelor</li> <li>- Factorul de stimulare a eozinofilelor</li> <li>- Factorul de creștere a sintezei IgA</li> </ul>	TRF BCGF-II EDF ESF
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Factorul 2 de stimulare a celulelor <i>B</i></li> <li>- Interferon <math>\beta</math> 2</li> <li>- Factorul de producere a imunoglobulinelor de către limfocitele <i>B</i></li> <li>- Factorul de stimulare a hepatocitelor</li> <li>- Interleukina 1 a hibridoamelor plasmocitare</li> <li>- Inductorul 2 al coloniilor de monocite-granulocite</li> </ul>	BSF-2 IFN $\beta$ 2 BCDF HSF HPGF
IL-7	- Limfopoietina 1	Lfp-1
IL-8	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peptidul atractant/activator al neutrofilelor</li> <li>- Factorul chemotactic al neutrofilelor derivat din monocite</li> </ul>	-
IL-9	- Proteina activatoare a neutrofilelor	-
IL-10	- Factorul de sinteză și inhibiție a citokinelor	-
IL-11	?	?
IL-12	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Factorul de creștere a celulelor matcă</li> <li>- Factorul de creștere a monocitelor</li> <li>- Factorul de stimulare a celulelor <i>NK</i></li> </ul>	SCGF MCGF NKSF

În prezent, cea mai mare parte dintre interleukine, atât cele de origine umană cât și murină au fost clonate, sunt cunoscute genele care le controlează sinteza și localizarea acestora la nivelul cromozomilor, multe dintre ele fiind produse industrial în vederea utilizării în terapia unor boli.

## INTERFERONII

Interferonii sunt proteine sau glicoproteine cu activitate anti-virală, anti-tumorală și imunomodulatoare, secretați de către diferite populații celulare infectate viral. Condiționat de caracterul celulelor producătoare și de structura lor moleculară, interferonii (IFN) aparțin la două tipuri distincte, și anume: tipul I sau interferonii  $\alpha$  și  $\beta$ , secretați de către leucocite (IFN $\alpha$ ) sau fibroblaste (IFN $\beta$ ), de tipul II



sau "imun" (IFN $\gamma$ ) secretat de către limfocitele *T* și celulele *NK* activate. Interferonii de tipul I sunt rezistenți la pH acid, pe când cei de tip II sunt sensibili (tabelul 62). Deși aparțin aceluiași tip, IFN $\alpha$  și IFN $\beta$  se deosebesc antigenic atât între ei cât și de IFN $\gamma$ , care de altfel este activ în concentrații mult mai mici decât cei de tipul I.

Tabelul 62

## Principalele caracteristici ale interferonilor

Caracteristica	IFN $\alpha$	IFN $\beta$	IFN $\gamma$
Denumirea veche	- Tip I leucocitar	- Tip I fibroblastic	- Tip II imun
Sursa	- Limfocite <i>B</i> - Macrofage	- Fibroblaste - Celule epiteliale - Macrofage	- Limfocite <i>T</i>
Inductori	- Virusuri - Agenți chimici	- Virusuri - Agenți chimici	- Antigene și mitogene ale limfocitelor <i>T</i>
Mediul acid (pH=2)	- Rezistent	- Rezistent	- Sensibil
Temperatura de 56°C	- Rezistent	- Rezistent	- Sensibil
Greutate moleculară	20 kD	20 kD	17 kD
Localizarea pe cromozomi a genelor care controlează sinteza IFN			
- uman	9	9	12
- murin	4	4	10
Subspecii moleculare			
- IFN uman	24	-	-
- IFN murin	12	-	-

Eterogenitatea moleculelor și a proprietăților lor biologice nu exclude posibilitatea identificării în viitor și a altor interferoni. De altfel, a și fost semnalată existența unor populații de astfel de molecule, denumită IFN $\delta$ , produsă de către celulele mononucleare umane stimulate cu PHA (fitohemaglutinină) în prezența de teleocidină, și IFN $\epsilon$  sau trofoblastic, strâns înrudit cu IFN $\alpha$ , produs de placenta și embrionii rumegătoarelor. Faptul că, în afară de limfocite, IFN sunt produși și de către alte celule, face discutabilă încadrarea lor în rândul limfokinelor. Totuși, această încadrare este justificată, deoarece ei au marcante funcții și efecte imuno-reglatoare și exercită, ca și limfokinele, efecte asupra sistemului imun chiar și atunci când se găsesc în cantități foarte mici.

În structura lor moleculară, IFN au un număr variabil de resturi de aminoacizi și diferite încărcături moleculare cu hidrați de carbon care se pare că nu sunt responsabili de activitatea biologică a moleculei. Într-adevăr, îndepărtarea hidraților de carbon nu are efecte semnificative asupra biologiei celulei.

Producția IFN este indusă de către microorganisme și în special virusuri, diferite extracte microbiene, polimeri sintetici de genul polisulfatilor, politiosulfatilor, polifosfatilor, acidului poli-inozil-policitidilic (poli I:C) etc. La rândul lor, induc sinteza altor citokine și exprimarea receptorilor pentru acestea.



**Interferonul  $\alpha$  (IFN $\alpha$ )** sau "leucocitar" este produs de către celulele albe sau liniile celulare limfoblastoide. La om și șoarece există diferite subtipuri moleculare, care se deosebesc între ele prin numărul de aminoacizi care intră în compoziția lanțului polipeptidic primar și, implicit, prin greutatea lor moleculară. În medie sunt 166 de reziduuri de aminoacizi, gena care le controlează asamblarea fiind localizată pe cromozomul 19. Dintre inductorii săi principali, mai importanți sunt virușii, unele bacterii, acidul poli I:C și unii polimeri sau substanțe cu greutate moleculară mică. Are efecte pozitive în terapia și prevenirea infecției cu virusul B al hepatitei epidemice (HbS).

**Interferonul  $\beta$  (IFN $\beta$ )** sau fibroblastic este produs de către fibroblaste și, ca atare, s-ar părea că încadrarea sa în grupa limfokinelor este incorectă. Totuși, el ar fi produs și de către leucocite, care ar exprima gene pentru această populație moleculară, iar receptorii care leagă INF  $\alpha$  și  $\beta$  sunt identici. Mai mult, peste 30% din secvențele aminoacide ale acestor două tipuri diferite sunt omoloage, iar inductorii sunt similari. Sinteza IFN  $\beta$  este controlată de către o singură genă. În linii generale, legarea IFN  $\alpha$  și  $\beta$  la receptori provoacă inhibiția creșterii celulelor tumorale, a proliferării limfocitelor stimulate *in vitro* cu lectine, stimulează activitatea citotoxică a celulelor NK, crește exprimarea antigenelor MHC, modifică structura suprafeței celulei etc.

**Interferonul  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )**, secretat de către limfocitele T ajutătoare și citotoxice ( $CD4^+$  și  $CD8^+$ ) și de celulele NK activate, este o glicoproteină cu 146 de reziduuri de aminoacizi și cu greutatea moleculară de cca. 17 kD, deosebită ca structură de interferonii de tip I. Sinteza IFN $\gamma$  este activată prin stimularea antigenică sau mitogenică a limfocitelor T și de prezența IL-2, dar este inhibată de IL-4. Gena este localizată pe cromozomul 12. Pe suprafața limfocitelor, macrofagelor, fibroblastelor, pe celulele epiteliale etc. există receptori de tip II pentru IFN $\gamma$  cu specificitate de specie și greutate moleculară 95-110 kD, diferiți de receptorii pentru IFN de tip I. Interacția IFN $\gamma$  cu receptorul induce transcrierea mai multor gene care conduc la sinteza de noi proteine dintre care unele, cum ar fi *proteinkinaza specifică* și *2'5'-oligosintetaza*, inhibă multiplicarea virală. Oligosintetaza activează o endoribonuclează care degradează ARNm viral, iar proteinkinaza specifică fosforilează subunitatea  $\alpha$  a factorului de inițiere a sintezei, blocând astfel transducția.

Interferonul  $\gamma$  exercită o pleoră de efecte imunomodulatoare, fiind un inductor al exprimării antigenelor MHC de clasa II și un element esențial în activarea citotoxicității monocitelor și macrofagelor, prin activarea sintezei de către acestea a oxidului azotic (NO) plecând de la Arg, NO fiind o moleculă efectoare potentă a citotoxicității antitumorale a macrofagelor. De asemenea, stimulează exprimarea receptorilor Fc pentru IgG cu afinitate mare pentru IgG monomer, activează citotoxicitatea NK, stimulează în asociere cu IL-2 funcțiile citotoxice ale limfocitelor Tc ( $CD8^+$ ), sinteza IL-1 etc.

Activitatea cheie a IFN $\gamma$  este activarea macrofagelor cu rol esențial în prezentarea antigenului de către limfocite, în eliberarea de monokine cu rol imunoreglator și în sinteza radicalilor de oxigen toxic. Într-un cuvânt, IFN $\gamma$  este principalul activator al exprimării moleculelor MHC de clasa II pe monocite și un component principal al activării reciproce a macrofagelor și limfocitelor T. *In vivo*, pe lângă activitatea sa imunoreglatoare și antivirală, este un factor crucial în conferirea rezistenței organismului față de infecția TBC, *Listeria monocytogenes*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* etc., deci, față de germeni cu localizare intracitoplasmatică. În acest scop, IFN $\gamma$  pe de o parte activează funcțiile fagocitare ale celulelor, iar pe de altă parte induce o creștere a rezistenței celulelor parazitare



față de acțiunea distructivă a parazitului acționând asupra triptofanului și, în consecință, asupra secvenței aminoacizilor din lanțul polipeptidic. Este un reglator al diferențierii limfocitelor *T*, un stimulator al funcțiilor citotoxice *T<sub>c</sub>*, *NK* și *K*, un inhibitor al proliferării clonale a limfocitelor, dar un activator al exprimării moleculelor MHC de clasa II și al funcțiilor limfocitelor *B*, influențând direct și indirect mecanismele de apărare antivirală, bacteriană sau neoplazică. Acționează sinergic cu IL-2, IL-4 și GM-CSF în conferirea rezistenței față de *Leishmania major*, stimulează funcțiile macrofagelor în apărarea față de *Legionella pneumophilis*, iar în combinație cu IFN $\alpha$  și  $\beta$  inhibă sinergic dezvoltarea *in vivo* a unor celule tumorale datorită efectului său antiproliferativ. Acționează sinergic cu prostaglandinele asupra celulelor *NK*, în sensul că prostaglandinele stimulează maturarea precursorilor *NK* iar IFN $\gamma$  funcția efectoare a celulelor *NK mature*.

Are însă și unele efecte "negative"; cum ar fi inhibiția sintezei prostaglandinelor indusă de IL-1, stimularea sintezei neurotoxinei, inhibiția proliferării keratinocitelor (care în psoriazis ar putea avea efect benefic), creșterea aderenței macrofagelor la glicoproteinele membranei bazale etc. Desigur, etichetarea de "efecte pozitive" sau "negative" este pur scolastică și nefiziologică deoarece, fiecare dintre acestea, la nivelul întregului organism, poate avea roluri bine definite în orchestrația populațiilor atât de numeroase ale mediatorilor solubili ai imunității.

În concluzie, interferonii de tip I sau II sunt citokine care stimulează producerea altor citokine, proliferarea limfocitelor *B*, sinteza imunoglobulinelor, și care inhibă multiplicarea celulelor normale sau transformate neoplazic. Totodată, sunt protectori potenți ai celulelor agresionate de către viruși sau de bacteriile cu localizare intracelulară.

#### FACTORUL DE NECROZĂ A TUMORILOR (TNF=TUMOR NECROSIS FACTOR).

În anul 1971 a fost semnalată existența unui factor care provoacă regresia tumorilor transplantate *in vivo*, cu efect citotoxic *in vitro*. Puțin mai târziu (1975), se descoperă că substanța activă, capabilă să inducă distrugerea tumorii, este prezentă în serul șoarecilor tratați în anumite condiții cu BCG și LPS, fiind secretată de către macrofagele activate cu LPS în cooperare cu limfocitele *T*. S-a mai constatat că macrofagele, astfel stimulate, sunt responsabile de cașexia observată în unele infecții parazitare și boli neoplazice deoarece secretă un factor care inhibă lipaza lipoproteică prezentă în adipocite, factor denumit "cașectină" și care, purificat în anul 1985, s-a dovedit a avea o secvență similară cu cea a TNF.

Există două subpopulații moleculare diferite de TNF: TNF  $\alpha$  sau "cașectina" și TNF  $\beta$  sau "limfotoxina", prima elaborată de către macrofage iar cea de a doua de către limfocitele aflate sub acțiunea LPS sau IFN $\gamma$ . Ambele molecule au fost izolate în stare pură și analizate funcțional.

TNF $\alpha$  (cașectina) are trei subunități  $\beta$ -helix cu greutatea moleculară de 17 kD, cu 157 reziduuri de aminoacizi și o singură legătură disulfidică realizată de reziduurile Cys de la pozițiile 69 și 101. Este analoagă cu capsida picornavirusurilor. Limfotoxina sau TNF $\beta$  este o moleculă cu 171 reziduuri de aminoacizi și o structură similară TNF $\alpha$ , deși omologia între ele, sub raportul secvenței aminoacizilor, este doar parțială: doar 30% omologie între moleculele  $\alpha$  cu cele  $\beta$  umane, în timp ce între TNF $\alpha$  uman și murin omologia este de 79%. Genele care controlează sinteza celor două tipuri de molecule sunt situate separat în

cadru complexului MHC de pe cromozomul 6 uman. Gena  $TNF\alpha$  are 4 exoni și 5 situsuri de fixare pentru factorul nuclear NF $\kappa$ B, iar cea pentru  $TNF\beta$  doar trei axoni.

În afară de celulele seriei mieloide incriminate inițial ca secretoare de TNF, în prezent se cunosc multe alte celule capabile de această funcție (tabelul 63).

Tabelul 63

#### Celule secretoare de TNF

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Monocite / macrofage</li> <li>- Limfocite T, B, NK, LAK</li> <li>- Granulocite PMN</li> <li>- Celule endoteliale și epiteliale</li> <li>- Mastocite</li> <li>- Fibroblaste</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Condrocite</li> <li>- Keratinocite</li> <li>- Celule mezangiale</li> <li>- Celule Langerhans</li> <li>- Astrocite</li> <li>- Trofoblaști</li> </ul>
--	--

După activare, toate aceste celule exprimă funcțional genele TNF. Activarea celulelor și sinteza acestor molecule sau inhibiția sintezei lor este sub controlul unor factori multipli (tabelul 64).

Tabelul 64

#### Factori inductori și inhibitori ai TNF

Factori inductori	Factori inhibitori
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toxina pertusis</li> <li>- <i>Bordetella pertusis</i></li> <li>- Stafilococii</li> <li>- Streptococii</li> <li>- Lectinele (PHA, ConA, PWM)</li> <li>- Zimozanul</li> <li>- Unele citokine (IL-1, IL-2, IFN <math>\gamma</math>, GM-CSF)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Glucocorticoizii</li> <li>- Prostaglandinele</li> <li>- Interleukinele (IL-4, IL-6, IL-10)</li> <li>- TGF<math>\beta</math></li> <li>- Alfaglobulinele</li> <li>- Serotonina, histamina</li> <li>- Catepsina</li> <li>- Elastazele leucocitare</li> <li>- Inhibitorii serin-proteazelor</li> <li>- Cloroquina</li> </ul>

Atât  $TNF\alpha$  cât și  $TNF\beta$  sunt liganzi pentru același receptor, o structură membranară cu greutatea moleculară de 75 kD, existentă la nivelul diferitelor țesuturi. Adipocitele, de exemplu, au cca. 10 000 de receptori pentru TNF pe suprafața lor. După legarea la receptori, citoxina este rapid internalizată și degradată, devenind responsabilă de numeroase efecte biologice care culminează cu cașexie și șoc.  $TNF\alpha$  stimulează producerea collagenazei de către celulele epiteliale și proliferarea fibroblastelor. În general, TNF exercită efecte pleiotrope asupra unui



mare număr de celule ca fibroblastele, osteoclastele, celulele endoteliale etc. (tabelul 65).

Tabelul 65

Diferite celule țintă asupra cărora acționează TNF

Celula țintă	Acțiunea
Celule tumorale	<p>Liza celulară ca urmare a:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- activării endonucleazelor endogene</li> <li>- fragmentării ADN</li> <li>- formării de pori în membrana plasmatică</li> <li>- activării sintezei moleculelor toxice de <math>O_2</math></li> </ul>
Linfocite T	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cofactor activator al timocitelor și limfocitelor T</li> <li>- Stimulează producerea de IL-2</li> <li>- Stimulează exprimarea receptorilor pentru IL-2</li> <li>- Stimulează exprimarea funcțiilor citotoxice a limfocitelor Tc</li> </ul>
Linfocite B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cofactor stimulant al proliferării limfocitelor B activate</li> <li>- Nu acționează asupra celulelor B în repaus</li> </ul>
Monocite / macrofage	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stimulează producerea de <math>PGE_2</math>, IL-1, IL-8</li> <li>- Împreună cu LPS activează funcțiile citotoxice și citostatice</li> <li>- Stimulează proliferarea astrocitelor</li> <li>- Activează producerea de <math>H_2O_2</math> și <math>O_2^-</math></li> <li>- Activează exprimarea pe membrana celulară a CD11b, CD11c, CD45.</li> <li>- Activează sinteza de <math>PLA_2</math></li> </ul>
Granulocite PMN	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vivo</i>, provoacă neutropenie rapidă urmată de neutrofilie</li> <li>- Activează metabolismul acidului arahidonic</li> <li>- Crește degranularea ca răspuns la <math>LTB_4</math> și PAF</li> <li>- Scade exprimarea pe membrană a LAM-1, CD43</li> </ul>
Fibroblaste	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induce sinteza de collagen și fibronectină</li> <li>- Induce sinteza de <math>PGE_2</math></li> <li>- Induce producerea de collagenază</li> </ul>
Hepatocite	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Scade sinteza de albumină</li> <li>- Crește sinteza proteinelor de fază acută</li> </ul>
Endoteliul vascular	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stimulează exprimarea moleculelor de adeziune</li> <li>- Stimulează exprimarea moleculelor MHC de clasă I</li> <li>- Mărește permeabilitatea vasculară</li> <li>- Stimulează sinteza de IL-1, IL-6, IL-8 și GM-CSF</li> <li>- Crește aderența mononuclearelor și polimorfonuclearelor</li> <li>- Inhibă angiogeneza</li> </ul>

Celula țintă	Acțiunea
Sistemul nervos central și periferic	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acționează asupra neuronilor din hipotalamus inducând febră prin intermediul IL-1 și PGE<sub>2</sub></li> <li>- Favorizează regenerarea axonilor</li> </ul>
Celulele sinoviale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induce producerea de PGE<sub>2</sub></li> <li>- Induce producerea de colagenază</li> <li>- Modulează sinteza metaloproteinelor</li> <li>- Modulează eliberarea de O<sub>2</sub></li> </ul>
Diverse alte efecte sistemice	- Cașexie, hipotensiune, modificarea ritmului cardiac, scăderea nivelului glicocorticoizilor și al Zn <sup>2+</sup> plasmatic

Activitatea antitumorală a TNF nu are specificitate de specie, unul dintre mecanismele majore prin care ar acționa fiind acela de stimulare a eliberării, de către macrofage, a speciilor active de oxigen. Nu se cunosc încă suficient de bine mecanismele prin care TNF ucide celula tumorală, fiind posibilă existența următoarelor secvențe: a) legarea TNF la receptori a căror exprimare este stimulată de către IFN $\gamma$ ; b) activarea metabolismului celular și eliberarea acizilor grași; c) generarea radicalilor de oxigen care ar leza ADN-ul celulei țintă; d) fragmentarea ADN-ului celulei țintă consecutiv activării sintezei de endonucleaze; e) activarea enzimelor lizozomale ale celulelor efectoare; f) mobilizarea glicogenului, scăderea pH-ului, moartea celulei (fig. 94). Șocul termic și proteinele de stres reduc susceptibilitatea celulelor tumorale la acțiunea TNF. De asemenea prostaglandinele stimulează activitatea acestei citokine, așa explicându-se de ce aspirina și indometacinul, care sunt inhibitori ai prostaglandinelor, inhibă și activitatea TNF.

Pe lângă efectul antitumoral, TNF are și acțiune antivirală similară cu cea a IFN, modulează producția de PAF, de prostaglandine, factori chemotactici, interleukine (IL-1, IL-6, IL-8), producerea de leucotriene de către granulocitele PMN etc. Are acțiune pirogenă, necrozantă, fiind un agent al șocului endotoxic care, acționând sinergic cu IL-1 și IFN $\gamma$  devine un important mediator al inflamațiilor. Totodată, este un inductor al apoptozei pentru limfocitele T autoreactive.

Măsurarea activității antitumorale a TNF se poate face cu ajutorul unor linii celulare cum ar fi linia L129 sau WEHI-164.

În unele stări patologice, cum ar fi infarctul miocardic, bolile neoplazice, arsurile, infecțiile parazitare, crește nivelul TNF $\alpha$  în umori, probabil ca urmare a stimulării celulelor producătoare. Tot TNF $\alpha$  este responsabilă de modificările cardiovasculare și de necrozele hemoragice observate în șocul septic.

Deși, ca și în cazul IFN, au fost puse multe speranțe în utilizarea TNF ca agent antitumoral eficient, totuși, inocularea acestei citokine *in vivo* a provocat decepții, deoarece nu s-a dovedit a fi atât de nocivă pentru tumori cum se spera. Mai mult, s-a constatat că generează unele efecte adverse nedorite, cum ar fi avortul spontan, endocardita necrozantă, fibroza pulmonară, hipersensibilitatea de contact etc.



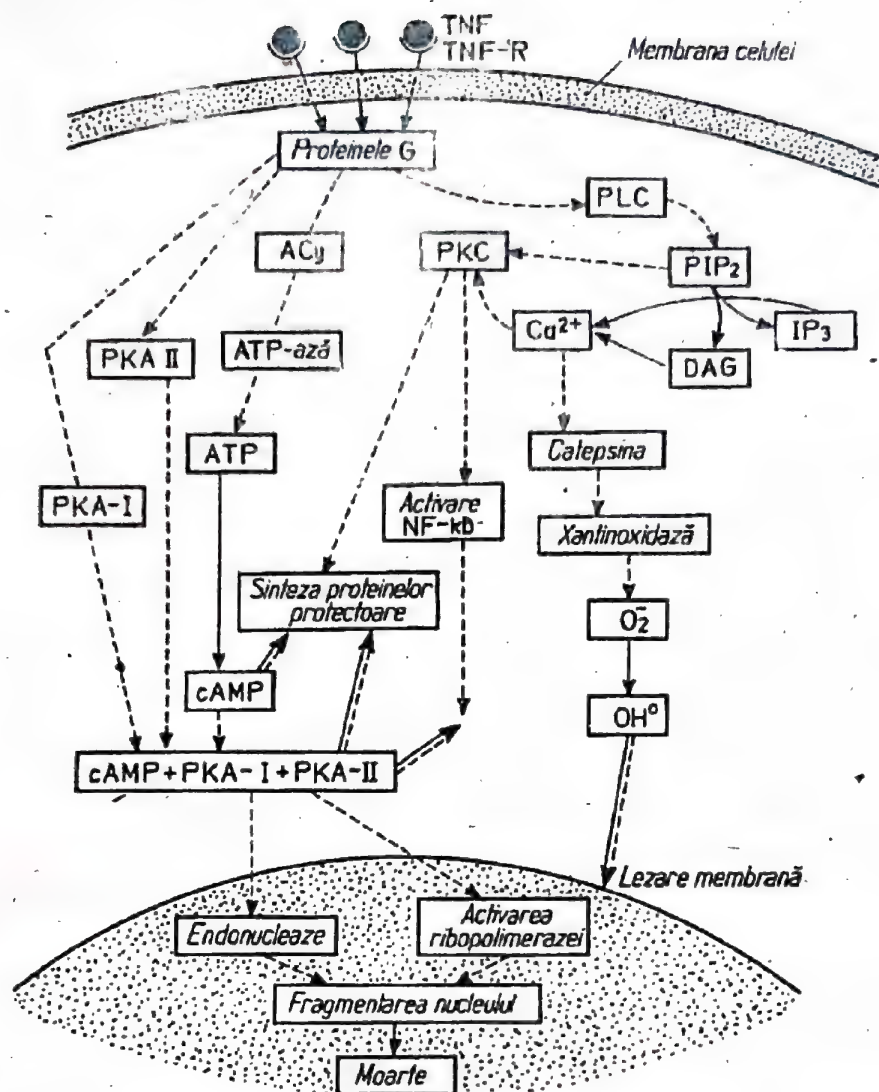


Fig.94. Mecanisme posibile prin care TNF poate leza celulele tumorale. După fixarea TNF la receptorul de membrană (TNF-R), se transmit semnale la proteinele G membranare. Acestea provoacă translocarea fosfolipazelor C (PLC) urmată de activarea inozitol-fosfaților cu formarea de inozitol-trifosfat (IP3) și diacil-glicerol (DAG) care vor mobiliza  $\text{Ca}^{2+}$  și vor activa proteinkinaza C (PKC). Concomitent, este activată adenilataciclaza (ACy) care, prin adenozin-trifosfatază (ATP-ază) va scinde adenozin-trifosfatul (ATP) în adenozin-monofosfat ciclic (cAMP). Combinarea cAMP cu proteinkinazele AI și AII (PKA-I, PKA-II) va bloca semnalele protectoare ale factorului nuclear (NF-κ), amplificând formarea endonucleazelor și ribonucleazelor care, în asociere cu efectul distructiv al hidroxil radicalilor (OH $\cdot$ ), vor fragmenta nucleul ucigând celula.

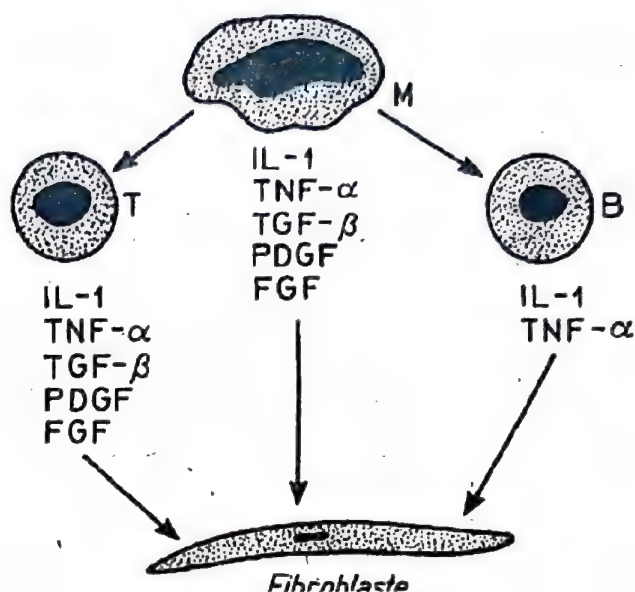
→ transformare sau activare; - - - inhibare ==> semnale inhibitoare cu efect distructiv.

### CITOKINE CARE INTERVIN ÎN PROCESE STIMULATORII INFLAMATORII ȘI REPARATORII TISULARE

Unele dintre acestea, cum ar fi IL-1 și TNF, au fost menționate anterior. În afară de acestea, în prezent au fost identificate peste 90 de citokine care intervin în astfel de procese, dintre care cele mai complex studiate sunt factorii TGF, PDGF, FGF și alții, care modulează proliferarea celulelor epiteliale, endoteliale, fibroblastelor etc. Unii dintre aceștia acționează direct asupra fibroblastelor, alții indirect dar, în

orice caz, un rol central în sinteza sau activarea lor revine macrofagelor care, expuse la diverși stimuli, transmit și primesc semnale de la alte celule ale sistemului imunitar ce vor secreta la rândul lor diferite citokine inductoare ale fibrinogenezei (fig. 95).

Fig.95. Citokine secretate de către macrofage (M), limfocite T sau B care stimulează fibrinogeneza.



În afară de macrofage, un rol important în fibrozarea țesuturilor revine limfocitelor T. O dovadă privind rolul acestor limfocite este faptul că șoarecii atimici *Nu / Nu* sau cei tratați cu ser anti-CD4 nu prezintă fibroze pulmonare, indiferent de stimulii care acționează asupra macrofagelor pulmonare.

**Factorul de stimulare a coloniilor granulocitare și macrofage (GM-CSF)** este o glicoproteină acidă cu greutatea moleculară de 22-23 kD și cu 127 de reziduuri de aminoacizi, care induce proliferarea și diferențierea progenitorilor hematopoietici și mărește funcția efectoră a granulocitelor și macrofagelor adulte, inclusiv sinteza factorilor de stimulare a fibroblastelor. Inițial a fost denumit "factorul de activare a macrofagelor", sau MAF. Genele care-i controlează sinteza au 4 exoni și sunt situate pe cromozomul 5 la om și pe cromozomul 11 la șoarece. Molecula are 4 situsuri de N-glicozilare.

Este sintetizată de limfocitele T stimulate antigenic sau cu diferite lectine și acționează stimulând proliferarea și diferențierea liniilor macrofagice și granulocitare. De asemenea, induce diferențierea megakariocitelor, eozinofilelor, iar în prezența eritropoietinei, contribuie la maturizarea eritrocitelor. Stimulează funcțiile monocitelor umane activându-le sinteza altor factori cum ar fi TNF, M-CSF, G-CSF. Totodată stimulează sinteza ARN, LDH (lactodehidrogenazei), activitatea tumoricidă, aderarea la celulele endoteliale, exprimarea antigenelor de histocompatibilitate de clasa I, exprimarea receptorilor pentru unele componente ale complementului etc.

**Factorul de stimulare a coloniilor granulocitare (G-CSF)** are greutate moleculară mică (0,6 kD) și o omologie semnificativă cu IL-6 și cu G-CSF de șoarece (peste 69,3%), din care cauză nu are specificitate de specie. În funcție de numărul reziduurilor de aminoacizi din componența moleculei, G-CSF umană are două forme diferite: una, G-CSF $\alpha$  cu 177 reziduuri și alta G-CSF $\beta$  cu 174 de reziduuri, sinteza ambelor fiind controlată de o genă cu 4 introni situată pe cromozomul 17. Este produsă de către monocitele și macrofagele stimulate cu endotoxine și INF $\gamma$ , de celulele endoteliale și de fibroblastele stimulate cu TNF sau IL-1, dar nu și de limfocite.



Acționează asupra hemocitoblastelor, precursorilor eritrocitari, asupra precursorilor granulocitari etc., stimulându-le diferențierea. Activează legarea peptidelor chemotactice la membrana granulocitelor PMN.

**Factorul de stimulare a coloniilor de macrofage (M-CSF)** este o glicoproteină homodimeră formată din două subunități identice între ele, legate prin legături disulfidice care reglează proliferarea și diferențierea celulelor din seria mieloidă (monocite, macrofage).

Glicozilarea moleculelor este foarte diferită, din care cauză greutatea lor moleculară variază de la 45 la 90 kD, subunitatea neglicozilată având greutatea de 14,5 kD. Gena care-i controlează sinteza este situată pe cromozomul 7, în vecinătatea genelor pentru IL-3 și GM-CSF. Este sintetizată de către celulele endoteliale, fibroblaste, monocite și chiar de către unele linii celulare maligne T, rămânând exprimate pe suprafața celulelor sau, după clivarea enzimatică, ajungând în circulație și în special în placentă ca molecule libere. Este eliminată prin urină. *In vivo*, induce formarea de colonii de precursori de macrofage și stimulează activitatea tumoricidă, secretorie și de eliberare a unor molecule toxice de oxigen de către macrofagele mature. De asemenea, stimulează sinteza acidului arahidonic.

Dacă GM-CSF are un spectru larg de acțiune, M-CSF și G-CSF au o activitate relativ restrânsă la nivelul unor linii celulare unice (tabelul 66). Dar, și într-un caz și în altul, acești factori au putut fi purificați, genele lor au fost clonate și secvențele reziduurilor aminoacide din lanțul polipeptidic primar cunoscute.

Tabelul 66

Unele caractere ale factorilor de stimulare

Factorul	Greutatea moleculară	Nr. aminoacizi	Gena pe cromozomul	Produs de către	Funcții
GM-CSF	22-23 kD	17	5 (om) 11 (șoarece)	-Limfocite T stimulate	- Stimulează proliferarea și diferențierea macrofagelor, granulocitelor  - Induce diferențierea megakariocitelor, eozinofilelor, eritrocitelor
G-CSF	0,6 kD	174 și 177	17	-Monocite/ macrofage stimulate cu endotoxine sau IFN $\gamma$  - Celule endoteliale - Fibroblaste	- Diferențierea granulocitelor PMN  - Acționează asupra precursorilor eritrocitari și asupra celulelor multipotențiale
M-CSF	45-90 kD	?	5	- Monocite  - Fibroblaste - Celule endoteliale	- Induce formarea de colonii de macrofage  - Stimulează activitatea tumoricidă, eliberarea de IL-1, TNF

**Factorul de activare a trombocitelor (PAF).** Implicat în reglarea unor răspunsuri imune mediate celular, este un mediator al reacțiilor inflamatorii și alergice. Inițial (1970), a fost descris ca un mediator cu potente posibilități stimulatorii pentru trombocite, eliberat de către granulocitele bazofile. Factorul este un participant activ la numeroase interacțiuni celulare.

Din punct de vedere chimic, este 1-alkil- 2(R)-acetil-glicero- 3-fosforilcolină (fig. 96) în care cei doi radicali R sunt fie  $C_{16}H_{35}$  fie  $C_{18}H_{37}$ .

Sinteza PAF implică activarea enzimei de membrană  $PLA_2$ , inhibitorii acesteia blocându-i formarea. Cum activarea  $PLA_2$  este dependentă de  $Ca^{2+}$ , stimularea mobilizării acestuia în interiorul celulei este urmată de sinteza și eliberarea de PAF.

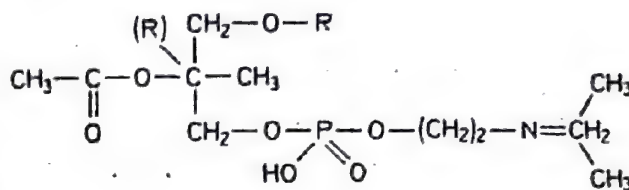


Fig.96. Structura factorului de aglutinare a trombocitelor (PAF).

Este produs de către granulocitele bazofile și trombocitele stimulate cu ionoforul A23187, trîmbină sau collagen, de către granulocitele PMN, monocite, macrofage, eozinofile stimulate cu același ionofor, de moleculele de IgE, zimozan etc.

Unele linii celulare leucemice de tip T sau B, cum ar fi MOLT-4, eliberează PAF atunci când sunt stimulate cu PHA sau cu ionoforul A 2318 7.

Receptorii pentru PAF sunt exprimați pe trombocite, eozinofile, neutrofile, monocite, precum și pe membrana celulelor epiteliului pulmonar.

Mediază agregarea trombocitelor, crește permeabilitatea vaselor și acumularea de trombocite la locul inflamației, induce bronhoconstricție, inflamația pulmonului, pielii, fiind un potent agent inflamator. Activează sinteza IL-1 și modulează unele efecte ale IL-2.

**Factorul de transformare a creșterii (TGF).** A fost identificat inițial ca produs al celulelor neoplazice sau al celor transformate fenotipic de către virusuri. Se găsește în principal în trombocite, măduva osoasă și rinichi.

Se cunosc două peptide distincte care au activitate biologică unică, dar care se fixează la receptori diferiți:  $TGF\alpha$  și  $TGF\beta$  cu speciile izoforme  $TGF\beta 1$ ,  $TGF\beta 2$  și  $TGF\beta 1.2$  cu greutatea moleculară de 25 kD formate din două subunități a câte 12,5 kD.

Aceste molecule, secretate de către trombocite și placentă, sunt implicate în procesele inflamatorii, vindecarea rănilor, dezvoltarea embrionilor și a tumorilor, adică în unele procese de proliferare celulară. Succesiunea momentelor ar fi următoarea: agregarea trombocitelor ca răspuns la agresiune → eliberarea de PAF și TGF → chemotactism PMN și macrofagelor → activarea limfocitelor → proliferarea fibroblastelor. În fond, TGF acționează indirect ca și chemoattractant pentru macrofage, celule care au receptori pentru aceste molecule. După fixarea la receptori, le stimulează sinteza de mediatori care vor acționa asupra fibroblastelor, celulelor endoteliale etc.

În momentul secreției TGF este inactiv, devenind activ numai după ce a suferit acțiunea unor enzime proteolitice secretate de către macrofage. În realitate, acest factor este un imunomodulator acționând ca stimulator al proliferării fibroblastelor și celulelor endoteliale, probabil prin stimularea sintezei factorului de creștere a endoteliilor (EGF) și FGF (factorul de creștere a fibroblastelor), a fibronectinei și procologenului și ca un inhibitor al limfocitelor T și B și al sintezei proteazelor



specifice. În acest fel, este blocată maturarea funcțională a moleculelor TGF proaspăt secretate.

**Factorul de creștere derivat din trombocite (PDGF)** este o proteină de 30 kD formată din două subunități a câte 17 kD legate între ele prin legături disulfidice. Există ca homodimeri și heterodimeri și sunt secretate de către macrofagele activate, fibroblaste, mușchii netezi și celulele endoteliale.

**Factorul de creștere a fibroblastelor (FGF)** este de fapt o populație de peptide acide (aFGF) sau bazice (bFGF) cu efect stimulator asupra proliferării celulelor mezenchimale și cu mare afinitate pentru heparină. Se găsesc în macrofagele peritoneale, în creier, adrenale, rinichi etc.

## ALTE CITOKINE

**Factorul de inhibiție a migrării leucocitelor PMN (LIF)** este de fapt o esterază susceptibilă ireversibil la acțiunea unor inhibitori ai serinesterazei care activează sinteza enzimelor lizozomale ale PMN. Are greutatea moleculară de cca. 70 kD și inhibă migrarea granulocitelor PMN, dar nu și a macrofagelor peritoneale.

**Factorul de inhibiție a migrării macrofagelor (MIF=migration inhibition factor)** este eliberat specific de către limfocitele T stimulate antigenic. Producerea MIF ar depinde de păstrarea capacității de sinteză a proteinelor de către limfocite și nu de cea de proliferare a lor. Prezența sa este detectată la 4-6 ore de la activarea celulelor *in vitro* și persistă cca. 48 de ore, după care începe declinul sintezei. Macrofagele ar avea receptori pentru MIF, bogați în  $\alpha$ -1- fucoză, care se regenerează după îndepărtarea lor prin mijloace enzimatice.

Se pare că suplimentarea mediului de cultură a limfocitelor cu glicolipide favorizează exprimarea numerică a acestora pe suprafața macrofagelor, fapt care ar sugera natura glicolipidică a lor. Este o mare variație în ce privește greutatea lor moleculară, variație înregistrată nu numai inter-specii de mamifere, ci chiar și în cadrul aceleiași specii. De exemplu, la om sunt molecule cu greutatea de 12 kD dar și cu greutatea mai mari, care ajung până la 25 kD, iar la cobai, între 15 și 670 kD, fapt care ridică problema dacă MIF este o moleculă sau o populație etero-genă de molecule.

**Factorul de "aglutinare" a macrofagelor (MAgF)** ar fi o limfokină secretată de către limfocitele T stimulate cu antigene sau mitogene care, ca și MIF, are diferite greutatea moleculare (50-370 kD), dar care se deosebește din punct de vedere antigenic de MIF și de moleculele de imunoglobuline. Factorul este stabil la pH situat între limitele 3-9 și la temperatura de 56° C, dar nu la 60°C. Este rezistent la hialuronidază dar sensibil la proteaze, fapt care sugerează posibilitatea ca MAgF să fie de fapt un acid hialuronic cu greutate moleculară mare. Specia de la care provine îi condiționează unele proprietăți. De exemplu MAgF, de iepure nu este sensibil la hialuronidază, pe când cel de cobai este sensibil la această enzimă. *In vitro* și probabil *in vivo*, aglutinează macrofagele (fig. 97), proprietate pe care o au și fibro-nectinele, o familie de glicoproteine cu greutate moleculară mare, alcătuite din subunități legate între ele prin legături disulfidice.

Ca și MAgF, fibronectinele au greutatea moleculare care variază de la o subunitate la alta și de la o specie de mamifere la alta. Fibronectina de cobai are subunități cu greutate de 240 de kD, dar și subunități cu greutate de 450 kD. Există o oarecare identitate între fibronectina plasmatică a cobaiului și cea a omului, atât în ce privește antigenitatea lor, cât și activitatea aglutinantă pentru macro-



fage. Probabil că MAgF este în realitate o fibronectină recunoscută de către diferitele molecule de adesiune de pe suprafața celulelor fagocitare.

**Factorul de creștere a epitelilor (EGF)** este un lanț polipeptidic cu cca. 53 reziduuri de aminoacizi și 3 legături disulfidice. Molecula are 6 kD greutate și multe proprietăți comune cu TGF- $\alpha$ . Acționează ca factor de creștere și keratinizare a epidermei, intervenind în vindecarea rănilor prin regenerarea epitelilor. Controlează diferențierea celulelor mucoasei intestinale și inhibă secreția gastrică acidă. Factorul este sintetizat de către limfocitele T și recunoscut de celulele epiteliale care exprimă receptori pentru el, niște glicoproteine transmembranare cu greutatea de 170-180 kD și trei domenii: unul extracelular la nivelul căruia este situsul de legare a EGF, cu cca. 550 reziduuri de aminoacizi, unul scurt transmembranar (24-24 reziduuri) și unul intracitoplasmatic cu situsuri de auto-fosforilare a tirozinkinazei.

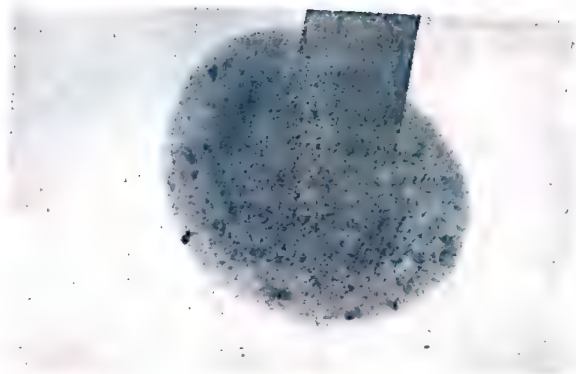


Fig.97. Aglutinarea macrofagelor migrate *in vitro* de către "factorul de aglutinare a macrofagelor" eliberat de limfocitele T (petele întunecate de pe suprafața ariei de migrare).

**Factorul de creștere a neuronilor (NGF)** este un trimer cu cca. 118 aminoacizi care stimulează utilizarea neurotransmițătorilor catecolaminici (dopamina și norepinefrina) de către nervi. Gena care-l controlează sinteza este localizată pe brațul scurt al cromozomului 1. Molecula este alcătuită din subunitățile  $\alpha$ ,  $\beta$  și  $\gamma$ , legate între ele nu prin legături disulfidice ci prin  $Zn^{2+}$ . Activitatea biologică, exercitată asupra nervilor simpatici și celulelor Schwann revine subunității  $\beta$ , subunitățile  $\alpha$  și  $\gamma$  fiind serinproteaze (kalicreine). În creier, NGF induce creșterea cantitativă a acetilcolin-transferazei, stimulând în felul acesta sinteza acetilcolinei.

Receptorii pentru NGF sunt exprimați la nivelul celulelor nervoase ale encefalului și nervilor periferici, precum și pe suprafața celulelor melanomatoase.

**Tuftsina.** Este un tetrapeptid cu secvența Thr-Lys-Pro-Arg care face parte integrantă din molecula de IgG, găsindu-se la nivelul domeniului  $CH_2$  al acesteia. Prin clivare enzimatică, este eliberată *in vivo* unde devine un potent stimulator al activității fagocitare și bactericide a granulocitelor PMN care exprimă pe membrana lor plasmatică cca. 50 000-100 000 receptori specifici. Stimularea fagocitozei indusă de tuftsina poate fi abrogată prin splenectomie, acest organ jucând un rol vital în generarea sa din IgG. Ar exista o enzimă la nivelul splinei care ar cliva tuftsina din fragmentul Fc al moleculelor IgG fixate la receptorul Fc de pe membrana PMN. Odată eliberată, se atașează la receptorii de pe membrana PMN, stimulându-le funcțiile fagocitare.

Legarea ei la receptori duce la creșterea nivelului intracelular al cGMP și scăderea nivelului cAMP, la activarea eliberării  $Ca^{2+}$  din celulă și la stimularea producerii de specii toxice de oxigen ( $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$ ,  $H_2O_2$ ) care ar exercita efectul citotoxic antibacterian și antitumoral. Receptorii sunt distribuiți uniform și difuz pe suprafața membranei plasmactice a granulocitelor dar, după legarea tuftsinei,



formează "pete", fiind rapid internalizați și apoi redistribuiți. Se pare că, în afară de granulocitele PMN, un număr mic de receptori ar fi și pe membrana macrofagelor și chiar a limfocitelor.

Această citokină stimulează activitatea tumoricidă și bactericidă a granulocitelor și macrofagelor, chemotactismul lor, le activează migrarea, mărește potențialul lor citotoxic etc. Ar mai stimula răspunsul limfocitelor la mitogene și citotoxicitatea celulelor NK (fig. 98). Nu influențează producerea de IFN și eliberarea enzimelor lizozomale.

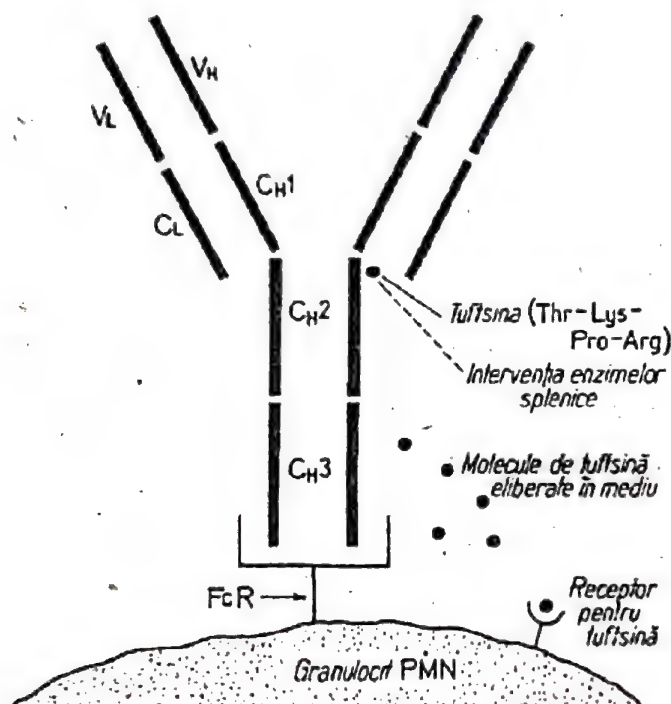


Fig.98. Detașarea tuftsinei de la nivelul moleculei IgG. După fixarea citofilă a IgG la receptorul de pe membrana granulocitului PMN ( $FcR$ ), intervin enzime eliberate de splină, care detașează tetrapeptidul situat la nivelul domeniului  $C_H2$ . Acesta se va fixa la receptorul pentru tuftsina de pe membrana plasmatică a aceleiași celule.

Există unele persoane care moștenesc congenital unele dezordini în sinteza tuftsinei sau care au în exces unii inhibitori ai acesteia. În astfel de situații, se înregistrează infecții rebele cu stafilococi, mielofibroze, leucemii, susceptibilitate la boli neoplazice.

Bolnavii splenectomizați devin foarte rapid deficienți în acest factor, potențialul ei de sinteză fiind rapid refăcut după retransplantarea splinei care va asigura producerea enzimei necesară clivării tuftsinei de la nivelul domeniului  $C_H2$  al moleculelor de IgG.

## ALTE FAMILII DE MOLECULE

### FAMILIA PROTEINELOR CARE LEAGĂ $Ca^{2+}$

Sunt proteine termostabile care leagă  $Ca^{2+}$  și activează fosfodiesterazele nucleotizilor ciclici, influențând profund procesele fiziologice ale celulei. Din această "familie" fac parte *troponina*, *calsechestrina*, *parvalbumina* și *calmodulina*, ultima fiind cea mai importantă. Calmodulina conține patru domenii de legare a  $Ca^{2+}$ . Participă la polimerizarea și depolimerizarea microtubulilor,

la fosforilarea receptorilor pentru hormoni, la eliberarea de neurotransmițători, la contracția mușchilor netezi. De asemenea, participă la sinteza ADN și mitoza celulară, nivelul său crescând direct proporțional cu rata de proliferare celulară. Antagoniștii calmodulinei, cum ar fi naftalensulfonamidele, vincristina, fenotiazinele, clorpro-mazina, tamoxifenul, propranololul, nifedipina,  $\beta$ -endorfina etc., inhibă asamblarea microtubulilor, activitatea fosfodiesterazelor, blocând progresia celulelor din faza de repaus  $G_0$  în ciclul celular și, deci, proliferarea lor. Ei inhibă proteinkinaza C, influxul de  $Ca^{2+}$ , și competiționează cu antagoniștii canalelor de  $Ca^{2+}$ .

Calmodulina ar servi și ca receptor pentru ciclosporina A, un inhibitor al transcrierii IL-2 și IFN $\gamma$ , proces care ar explica oarecum efectele inhibitorii ale ciclosporinei A.

#### FAMILIA PROTEINELOR CU FUNCȚII DE "HORMONI LOCALI"

**Prostaglandinele (PG)** sunt compuși biologici produși practic de către țesuturile organismului care au suferit un proces de stimulare sau de iritare a membranei plasmactice. Sunt sintetizate în interiorul sau în apropierea locului "iritat" și au fost considerate ca "hormoni locali" produși în apropierea celulelor țintă, fără a avea activitate sistemică. PG sunt printre cele mai active și mai răspândite substanțe în natură, prezența lor fiind semnalată la viețuitoarele inferioare cum ar fi corali sau chiar la specii din lumea vegetală. Deoarece sunt produse local în cantități foarte mici și au o durată de existență foarte scurtă datorită catabolizării lor rapide, concentrația lor în ser este extrem de mică. În condiții normale se găsesc cca. 10 pg / ml pentru ca, în arsurile grave sau în leziuni iritative care interesează suprafețe mari ale pielii, concentrația lor în ser să atingă valori până la 1 000 - 3 000 pg/ml.

Din punct de vedere chimic, PG sunt acizi grași nesaturați, hidrolizabili și polioxigenați, cu 20 de atomi de C, care conțin un inel de ciclopentan. Sunt produse în urma acțiunii enzimei ciclooxygenază asupra acidului arahidonic eliberat din fosfolipidele membranei plasmactice. Sinteza lor poate fi indusă de către o multitudine de stimuli care perturbă membrana plasmatică a celulei, cum ar fi IL-1, TNF- $\alpha$ , LPS, componentele complementului etc. În general au efect inhibitor asupra mitozei *in vitro* a limfocitelor T, a producerii de IL-2, sintezei de IgM de către limfocitele B etc. Efectele lor inhibitorii sunt provocate de legarea moleculei la receptorii de membrană, proces care stimulează un mesager secund, și anume cAMP.

Scheletul de bază al moleculei este format din "acidul prostanic" cu o formulă chimică încă ipotetică (fig. 99). Cele mai neînsemnate modificări ale acestui

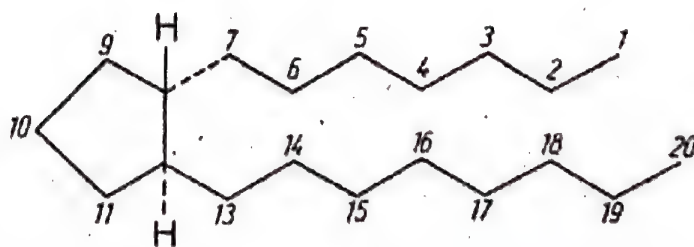


Fig.99. Formula ipotetică a acidului prostanic.



schelet duc la conferirea unor efecte biologice total diferite moleculelor derivate din el. Toate moleculele, însă, au un atom de O la C<sub>9</sub>, un OH la C<sub>5</sub> și una sau două duble legături între doi atomi de carbon. Pe baza structurii și activității lor biologice, se cunosc clasele A, C, D, E, F și I, în cadrul claselor putând exista molecule cu una sau două duble legături. Deci, pot fi PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> etc., de regulă cele mai abundente fiind moleculele de tip 2. Granulocitele PMN transformă o PG în alta prin mecanisme dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de mieloperoxidaze lizozomale și de ioni de Cl. Cele mai cunoscute și răspândite sunt clasele E, bronhodilatatoare, cu rol important în reglarea răspunsului imun și cele F, bronhoconstrictoare.

Sinteza PG și formarea diferitelor clase de molecule au oarecum un caracter particular. După cum se știe, membrana celulară este un dublu strat lipidic fluid, în care plutesc ca niște "iceberg-uri" diferite proteine sau glicoproteine, adevărați "markeri" antigenici sau "receptori" de membrană. În mod normal, fosfolipidele de membrană sunt astfel dispuse încât sunt inaccesibile factorilor normali din mediul exterior al celulei. În cazul unui stimul care depășește intensitatea sau condiția normalului, fosfolipidele, prin reorientarea moleculelor în spațiu, devin accesibile acestor factori. Din ele se formează acidul prostanoic care, sub acțiunea fosfolipazelor, se transformă în acid arahidonic, un acid gras, precursor al tuturor moleculelor de PG (fig. 100). Acest acid acționează ca un mesager intracelular și intercelular. El este de fapt format din esterificarea lipoproteinelor cu densitate mică din membrana plasmatică a celulelor sub acțiunea fosfolipazelor A, C și D.

Acțiunea lipooxygenazelor asupra acidului arahidonic duce la formarea de leucotriene, participante majore în procesele inflamatorii, iar diversele sisteme generatoare de radicali de oxigen de genul O<sub>2</sub><sup>-</sup> induc formarea lipidelor chemotactice.

Sub acțiunea prostaglandinsintetazei și a unor cofactori, are loc hidroliza enzimatică a acidului arahidonic care, consecutiv atacului unui complex enzimatic microzomial - "endoperoxidsintetaza" - se transformă în endoperoxizii intermediari PGG<sub>2</sub> și PGH<sub>2</sub>.

Complexul superoxid-sintetază prezent în membrana tuturor celulelor organismului, cu excepția hematiilor, are două activități enzimice distincte: de

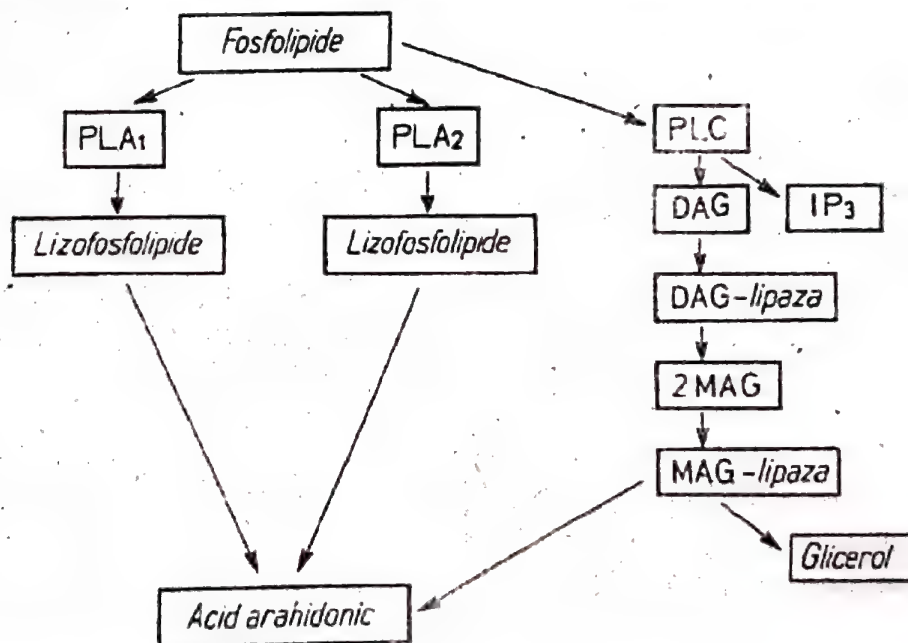


Fig.100. Modalități de sinteză a acidului arahidonic ca urmare a stimulării unor enzime cu impact asupra fosfolipidelor membranare. DAG = diacil-glicerol; IP<sub>3</sub> = inozitol-trifosfat; MAG = monoacilglicerol, PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub>, PLC = fosfolipaze A1, A2, C.

"ciclooxygenază" și de "peroxigenază". Sub efectul ciclooxygenazei se formează endoperoxidul, iar peroxidaza facilitează intervenția enzimei prostaglandinsintetază cu formarea  $\text{PGG}_2$  din care, prin legarea unui grup OH la  $\text{C}_{15}$ , se formează  $\text{PGH}_2$ . Endoperoxizii de viață scurtă,  $\text{PGG}_2$  și  $\text{PGH}_2$ , sunt rapid metabolizați prin reacții catalizate, generând șase produse diferite:  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGI}_2$  (denumită și prostaciclina), acidul heptadecatrienoic (HHT) și tromboxanul  $\text{A}_2$  ( $\text{TxA}_2$ ). Intervenția unei izomeraze transformă prostaglandinele E în PGA și PGB, iar dehidrogenazele metabolizează rapid  $\text{PGE}_2$  și  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , metabolizare care are loc în special la nivelul pulmonului.

Inițial s-a crezut că PG, pe lângă efectul fiziologic predominant de contractare și relaxare a mușchilor netezi, au rol doar în procesele inflamatorii. Ulterior, însă, a devenit clar faptul că ele au o multitudine de funcții biologice (tabelul 67), intervenind în procesele fiziologice care au loc la nivelul mușchilor netezi, în transmisia influxului nervos, în interacțiunile hormonale și implicit, în cele imune.

Tabelul 67

## Activitatea biologică a unor clase de prostaglandine

Prostaglandina	Activitatea biologică
A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Influențează metabolismul hidraților de carbon</li> <li>- Stimulează sinteza cAMP</li> <li>- Este implicată în transmiterea impulsurilor la nivelul sistemului nervos central</li> </ul>
$\text{E}_1$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stimulează formarea trombusurilor</li> <li>- Inhibă agregarea trombocitelor</li> <li>- Produce vasodilatație</li> <li>- Bronhodilatator</li> <li>- Stimulează sinteza cAMP</li> <li>- Inhibă excitația nervoasă</li> <li>- Inhibă fosforilarea proteinelor</li> <li>- Puternic efect chemotactic</li> <li>- Crește rata infiltrării granulocitelor PMN</li> </ul>
$\text{E}_2$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Produce vasodilatație și dilatarea bronhiilor</li> <li>- Inhibă excitația nervoasă (inhibă eliberarea de noradrenalină)</li> <li>- Crește rata infiltrării granulocitelor PMN</li> <li>- Stimulează sinteza cAMP</li> <li>- Inhibă exprimarea antigenelor DR pe membrana celulei</li> <li>- Inhibă proliferarea precursorilor granulocitari și macrofagici din celula matcă</li> </ul>
$\text{F}_{2\alpha}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Are activitate vasoconstrictoare și bronhoconstrictoare</li> <li>- Stimulează sinteza cGMP</li> <li>- Provocă regresia corpului galben (luteoliza)</li> </ul>



Dar, pe lângă contractarea și relaxarea mușchilor netezi din organele sistemului respirator, digestiv, genito-urinar etc., ele au un rol în transmiterea impulsurilor implicate în medierea durerii, influențează metabolismul hidraților de carbon, produc regresia funcțională și morfologică a corpului galben de gestație (luteoliza), inhibă formarea trombușilor, au efect hipotensiv, inhibă secreția sucului gastric, măresc motilitatea stomacului etc. În linii generale, prostaglandinele E potențează acțiunile mediatorilor proinflamatorii, cele F contracarând aceste efecte.

De dată mai recentă s-a constatat că, pe lângă aceste multiple funcții fiziologice, PG și în special cele din clasa E au un rol important în procesele imune, intervenind în principal ca mediatori cu funcții supresoare. Ele interacționează reversibil cu cei cca. 200 de receptori de pe suprafața limfocitelor la o constantă de legare  $K=2 \times 10^{-9}$  M, stimulând sinteza cAMP cu inhibarea fosforilării proteinelor. Prostaglandinele influențează comportarea celulei, inducând schimbări în funcțiile membranei, căreia îi alterează compoziția în lipide, proteine și glicoproteine și, în consecință, induc schimbări în fluiditatea și permeabilitatea membranei, alterări în captarea  $Ca^{2+}$  etc. Creșterea nivelului cAMP în citoplasmă duce la scăderea nivelului cGMP (guanidin-monofosfatul ciclic), ambele având acțiuni antagoniste (tabelul 68).

Tabelul 68

Exemple de antagonism funcțional la nivelul celular al adenzin-monofosfatului ciclic (cAMP) și guanidin-monofosfatului ciclic (cGMP)

Mediatorul	Influența asupra celulelor
cAMP	Inhibitor al: <ul style="list-style-type: none"> <li>- proliferării celulare</li> <li>- producerii de limfokine</li> <li>- citolizei mediate celular</li> <li>- formării rozetelor</li> <li>- sintezei de anticorpi</li> </ul>
cGMP	Activator al: <ul style="list-style-type: none"> <li>- proliferării celulare</li> <li>- producerii de limfokine</li> <li>- citolizei mediate celular</li> <li>- formării rozetelor</li> <li>- sintezei de anticorpi</li> </ul>

O sursă majoră de PG o constituie macrofagele care, sub acțiunea unor diverși stimuli (zimozan, *C. parvum*, endotoxine, colchicină, ConA, complexe imune antigen-anticorp etc.), sintetizează clasele  $PGI_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_2 \alpha$  și  $TxB_2$ . În general, metabolismul acidului arahidonic joacă un rol important atât în expri-

marea funcțiilor fagocitare a macrofagelor, cât și în stabilirea interacțiunilor macrofag-limfocit.

Este o relație inversă între secreția de IL-1 și PG, dar și între secreția limfokinelor și acești derivați ai acidului arahidonic. Sinteza PG, de către macrofage este activată și de către stimulul pe care-l exercită tumorile asupra celulelor fagocitare. Mai mult, chiar celulele tumorale pot secreta acești mediatori, fapt care ar putea explica în parte mecanismele care stau la baza scăpării tumorii de sub supra-vegherea imunologică.

Dar și lectinele care stimulează limfocitele și induc o activare a sintezei limfokinelor activează eliberarea de către macrofage a PG care vor inhiba producerea în continuare a limfokinelor, constituind un alt mecanism de control al răspunsului imun. Se poate deci afirma că PG sunt mediatori solubili cu rol important în reglarea răspunsului imun, ele contracarând toate procesele care pot duce la hiperplazii celulare sau la hiperfuncția acestor celule.

**Hormoni secretați de către organele limfoide primare.** Rolul major al acestor mediatori solubili îl reprezintă maturarea funcțională a limfocitelor *T* și *B*. Inițial, existența lor a fost pusă în evidență cu ajutorul unor metode relativ simple. S-a observat că efectul timectomiei neonatale este anulat dacă șoarecii sunt grefați cu fragmente de timus care, fie că sunt implantate în cavitatea abdominală ca atare, fie că sunt închise în niște camere confecționate din membrane Millipore cu diametrul porilor de  $0,45 \mu$ . Datorită dimensiunilor mici ale porilor din pereții acestor membrane, penetrarea precursorilor limfocitari și contactul lor cu timusul nu se putea realiza, în schimb, era posibilă difuzarea moleculelor secretate de către acest organ. Maturarea funcțională a precursorilor limfocitari fără un contact direct cu țesutul timic a constituit o dovadă certă a funcțiilor sale secretorii și a rolului său de organ esențial în maturarea normală și în menținerea la nivel funcțional a diferitelor subsete de limfocite *T*. Aceste funcții au fost mai bine cunoscute după izolarea din timus sau sânge și caracterizarea chimică și biologică a factorilor secretați. S-a dovedit că aceștia au proprietăți similare hormonilor, în sensul că au efecte multiple asupra celulelor și sunt biologic activi în concentrații extrem de mici.

Au fost identificați și caracterizați diverși factori de origine timică ce induc diferențierea celulelor *T* imature, cu exprimarea antigenelor și receptorilor de membrană și a diferitelor funcții biologice ale lor. Dintre cele mai bine cunoscute sunt familia timozinelor, timopoietinelor, timostimulinei, diverșilor factori timici etc. (tabelul 69).

**Timozina.** După o scurtă încălzire la temperatura de  $80^{\circ}\text{C}$  a omogenatului de timus de vițel și extracție cu acetonă, se obține un grup de polipeptide cu greutatea moleculară de 1-15 kD, care alcătuiesc timozina fracțiunea 5, un hormon timic format din trei clase principale:  $\alpha$ ,  $\beta$  și  $\gamma$ . Prin purificări ulterioare prin cromatografie de schimbători de ioni și prin gel-filtrare, sunt obținute 7 peptide din clasa  $\alpha$  și 4 din clasa  $\beta$ , (cele mai bine caracterizate fiind  $\alpha 1$ ) cu 28 de resturi de aminoacizi și greutatea de 3,1 kD și  $\beta 1$  cu 74 de resturi și 15 kD greutate moleculară.



Mediatori solubili secretați de către timus

Denumirea mediatorului	Simbolul	Greutatea moleculară	Activitatea biologică
Timozina 5: Clasa $\alpha$ : $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_4, \alpha_6, \alpha_7$ Clasa $\beta$ : $\beta_1, \beta_4$	-	1 - 15 kD	- Induce limfocitopoieza - Activează diferențierea limfocitelor T - Stimulează exprimarea funcțiilor limfocitelor T ajutătoare (Th)
Timopoietina I și II	-	5 - 7 kD	- Inhibă transmiterea neuromusculară - Induce exprimarea antigenelor specifice celulelor T
Factorul umoral timic	THS	3,2 kD	- Restaurează <i>in vivo</i> și <i>in vitro</i> componenta imunologică mediată celular
Factorul seric timic	TFS	1 kD	- Induce exprimarea antigenelor specifice celulelor T
Timostimulina	TS	12 kD	- Activează exprimarea receptorului E (CD2) - Stimulează răspunsul <i>in vitro</i> la stimulii cu lectine

Structura primară a timozinei  $\alpha_1$  este următoarea:

Ser-Asp-Ala-Ala-Val<sup>5</sup>-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp<sup>10</sup>-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu<sup>20</sup>-Ala-Glu-Asp-OH<sup>25</sup>.

Timozina induce diferențierea și maturarea timocitelor și precursorilor imaturi ai limfocitelor T, exprimarea receptorilor E (CD2), activarea funcțională a limfocitelor T ajutătoare (CD4) etc. Cu vârsta, nivelul seric al ei scade direct proporțional cu involuția timusului. Administrarea de timozină *in vivo* crește rata de supraviețuire la șoarecii timentomizați. Accelerează rejecția alogrefelor, induce exprimarea antigenelor de suprafață de pe limfocitele T, activarea celulelor T citotoxice, T supresoare, NK etc.

De asemenea, mărește rezistența la infecții cu *Listeria monocytogenes* răspunsul T și B la stimuli mitogenici *in vitro* etc.

**Timopoietina.** Sunt cunoscute de fapt timopoietinele I, II și III, niște polipeptide izolate din timusul bovin care au cca. 49 de aminoacizi. Sunt înrudite între ele și cunoscute din punct de vedere al structurii primare.

Inhibă transmiterea neuromusculară, induce exprimarea markerilor specifici limfocitelor T la șoarecii Nu/Nu lipsiți congenital de timus, activează precursorii celulelor T citotoxice, inhibă diferențierea timpurie a limfocitelor B din precursorii medulari. Are importante funcții imunoreglatoare.

**Factorul umoral timic (THF)**, izolat din omogenat de timus de vițel prin ultra-centrifugare, dializă, gel-filtrare pe coloană de Sephadex G-10 și G-25, urmată de cromatografie pe schimbători de ioni. Este un polipeptid cu greutate moleculară 3220, în compoziția căruia intră 4 resturi de Asp, unul de Thr, cinci de Ser, opt de Glu, doi de Pro, cinci de Gly, doi de Ala, unul de Leu, unul de Lys și doi de Arg. Reduce

exprimarea antigenului TL (*T leukemia*) caracteristic limfocitelor *T* imature și celor leucemice, crește reactivitatea *in vitro* a limfocitelor stimulate cu mitogeni, răspunsul limfocitelor la antigenele virale și grefele de țesut xenogen, activează funcțiile citotoxice antitumorale etc.

*Timostimulina (TS)* este de fapt un grup de polipeptide cu greutate moleculară 12 000 D. Se obțin din timusul de vițel prin extracție cu acetat de amoniu încălzit la 70°C și precipitare cu  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  saturat 45% și 90%. Precipitatul se dizolvă în apă, este ultrafiltrat, trecut pe coloană de Sephadex G-25 și apoi pe Sepharoză G-50. Din acest grup, mai bine cunoscute sunt două peptide: fracțiunea 6 B cu greutatea moleculară 5 600 D și fracțiunea 7 B, similară unui alt hormon, ubiquitina.

TS induce exprimarea markerului Thy-1 la șoarece și a receptorului E la subiecții imunodepresați, cu toate că doze suboptimale pot inhiba formarea rozetelor E. Mărește răspunsul limfocitelor la stimuli lectinici, întârzie dezvoltarea tumorilor transplantate la șoarece și crește rata de supraviețuire a animalelor la care s-au transplatat tumori.

*Factorul seric timic (TFS)* a fost izolat din serul de porc și este activ asupra celulelor formatoare de rozete. Lipsește în serul animalelor timectomizate sau a șoarecilor *Nu/Nu*, dar reapare după grefarea acestora cu timus, fapt care argumentează originea sa timică. Are greutatea moleculară 867 kD și următoarea secvență primară: Glu-Ala-Lys-Ser-Glu-Gly-Ser-Asp. Induce exprimarea diferiților markeri pe celulele imature de șoarece și om, activează *in vivo* și *in vitro* limfocitele *T* citotoxice și supresoare și inhibă reacțiile de hipersensibilitate de tip întârziat și imediat, în special cele declanșate de DNPB (dinitro-fluor-benzen).

*Timomodulina (lactoferina)* este un extract timic preparat prin hidroliză acidă (HCl) din timusul de vițel. Hidrolizatul este deproteinizat prin precipitare izoelectrică și gel-filtrare pe coloane de Sephadex-G25 pentru a se elimina peptidele cu greutate moleculară >10 kD. Se obține timomodulina, un amestec complex de polipeptide acide cu greutate moleculară mică, care este un preparat biologic activ, ce reglează maturarea limfocitelor pre-*T* la om și șoarece și modulează funcțiile limfocitelor *T* și *B* mature.

*Ubiquitina (sau ubicvitina)* este un polipeptid cu greutate moleculară de 8,4 kD format din 74 de aminoacizi prezenți în concentrații mici în timus și în majoritatea țesuturilor animalelor și chiar ale plantelor. Are marcante proprietăți de stimulare a diferențierii limfocitelor, fiind capabilă să inducă atât diferențierea precursorilor limfocitari *T* cât și a celor *B*. Acest hormon diferă de ceilalți secretați de către timus prin faptul că este activ și pentru precursorii *B*, că este produs și de către alte țesuturi și nu este asociat cu dereglări în neurotransmisia musculară, cum este cazul timopoietinelor care, la om, sunt asociate cu *miastenia gravis*, o atrofie a mușchilor datorată unor alterări în sinteza și prezența acetilcolinei la nivelul sinapselor neuro-musculare, asociată frecvent cu "timite" autoimune. Ubiquitina ar exercita controale la nivelul genomului celular, ar servi ca un semnal inductor al clivării proteinelor de către proteaze și ar avea o activitate hormonală care ar induce diferențierea precursorilor celulari în limfocitele *T* și *B* imunocompetente.

*Bursina*, denumită inițial *bursopoietina*, este un hormon de diferențiere selectivă a limfocitelor *B*, sintetizat la nivelul bursei lui Fabricius. În componența sa există o secvență tripeptidică (Lys-His-Gly-) ce activează sinteza cGMP și multiplicarea limfocitelor *B*, dar nu și a celor *T*. Molecula are greutate mică și acționează selectiv, dar nu strict specific. Ea stimulează atât proliferarea limfocitelor *B* de pasăre, cât și a celor de mamifere, cum ar fi linia Daudi de limfocite *B* umane.

Deci, timusul și hormonii săi peptidici au rol central în maturarea celulelor *T* și funcționarea lor după maturare, preparatele timice, care variază ca proprietăți biologice și potență, fiind larg utilizate pentru restaurarea unor disfuncții imune. În clinică, restaurarea și accelerarea maturării precursorilor celulari s-a dovedit



salutară în cazul unor imunodepresii cu etiologie diferită, în unele boli neoplazice etc. De exemplu, timozina fracțiunea 5 are efecte salutare în tratamentul imunodeficitelor primare la om, cum ar fi atimia congenitală (sindromul Di George) sau alte imunodeficiente asociate cu displazia sau hipopalazia acestui organ. Mai mult, inocularea ei *in vivo* stimulează proliferarea unor subpopulații de limfocite T reglatoare, cu funcții ajutătoare, supresoare, contrasupresoare etc.

Există preparate comerciale, ca Leucotrofina, Imunotimul etc., care se administrează uzual în diferite imunodeficiente și în special la bolnavii cu neoplazii. Utilizarea lor se bazează în principiu pe acele efecte ale hormonilor timici care, în linii mari, controlează migrarea precursorilor timpurii din măduvă către timus, cum este cazul timopoiectinelor I și II, transformarea lor în timocite, activarea evoluției lor spre celule imunocompetente. Totuși, administrarea acestor preparate comerciale trebuie făcută pe baze raționale, după o prealabilă determinare a prezenței sau absenței acestor hormoni, a efectului lor *in vitro* asupra celulelor sistemului imun. În caz contrar, există riscul obținerii unor rezultate nule sau chiar contrarii celor scontate.

#### ROLUL CITOKINELOR ÎN REGLAREA HEMATOPOIEZEI

Există un sistem complex hematopoietic care menține în limite normale populația celulară din circulația periferică. Elementele lui reacționează prompt, stimulând sau inhibând proliferarea acestor populații în cazul devierii lor de la limitele normale. Ar fi o *hematopoieză constitutivă* generată de proliferarea normală a precursorilor celulari derivați din celula matcă, și o *hematopoieză inductibilă* instalată în urma unor stimuli mai mult sau mai puțin nocivi.

În primul caz, refacerea elementelor figurate ale sângelui se face normal, prin înlocuirea automată a celulelor îmbătrânite cu celule tinere. În cel de al doilea caz, refacerea se face rapid, pentru a înlocui celulele moarte din cauza unor infecții grave sau a unor diverse alte agresiuni. În acest caz, intervin rapid diferite citokine cu rol de factori de creștere, produse în cantități mari de către limfocitele T în special, macrofage, fibroblaste etc. Acestea acționează direct asupra celulei matcă sau asupra hemocitoblaștilor angajați deja pe linii precise de maturare (fig. 101). Citokinele modulează hematopoieza în sensul activării sau inhibiției ei (tabelul 70). De fapt, interacționează între ele stimulându-se reciproc, astfel că factorii de creștere care acționează direct asupra progenitorilor hematopoietici sunt în realitate puțin numeroși dar, pentru a putea fi generați, necesită influența unui număr mare de mediatori solubili (fig. 102). La rândul lor, multe citokine sunt sub influența altor factori care nu intră în categoria "limfokinelor" sau "monokinelor". De exemplu, glicoproteinele care pot lega unii ioni metalici, cum ar fi lactoferina, transferina sau izoferitina, au efecte supresoare asupra mielopoiezei, inhibând dezvoltarea celulei matcă sau producerea unor factori de creștere.

Tabelul 70

Citokine cu efect modulator în hematopoieză

Efectul citokinei	Citokina implicată
Stimulator	IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 G-CSF, M-CSF, GM-CSF
Inhibitor	IFN, TNF, TGF- $\beta$ , PGE <sub>2</sub> , lactoferina, transferina, feritinele

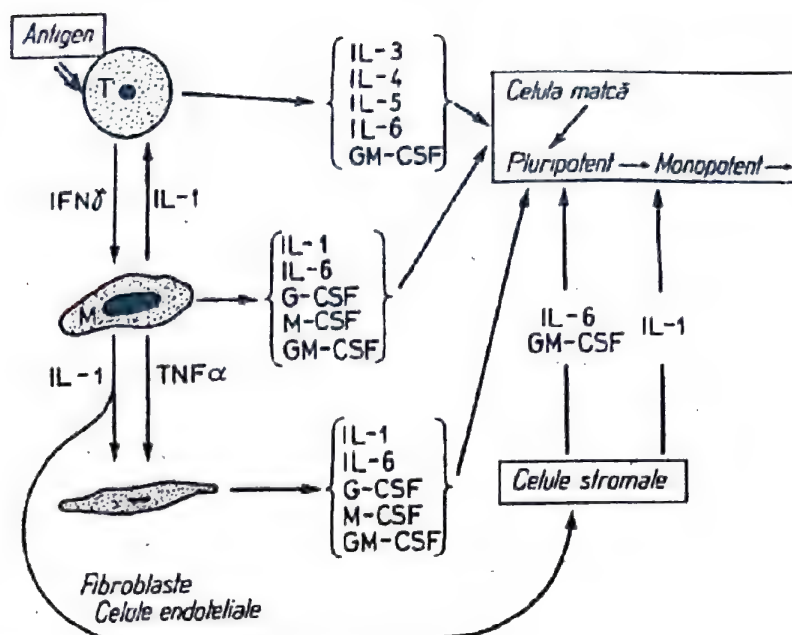


Fig.101. Intervenția unor citokine în reglarea hematopoiezei. Limfocitele T stimulate specific de către antigen eliberează limfokine, care vor stimula atât macrofagele cât și celulele matcă. Se realizează o "rețea" complexă de mediatori solubili care se condiționează reciproc.

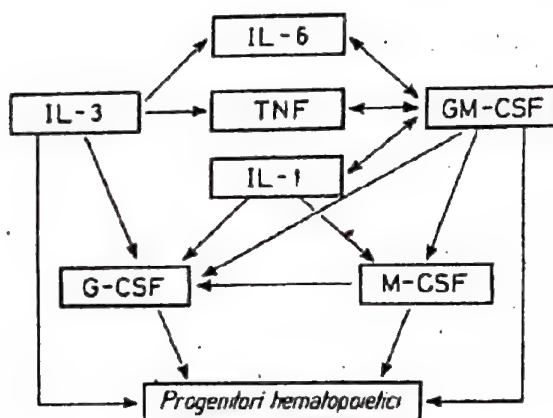


Fig.102. Diferite citokine care controlează proliferarea precursorilor hematopoietici.

În prezent se încearcă aplicarea în terapie a unor factori de creștere cum ar fi IL-3, G-CSF, M-CSF sau GM-CSF cu rezultate încurajatoare în pancitopeniile induse viral sau terapeutic (radioterapia și chimioterapia antineoplazică).

#### IMPLICAREA CITOKINELOR ÎN PROCESUL INFLAMATOR

Inflamația este un răspuns fiziologic violent la agresiunea brutală a unor agenți mecanici sau infecțioși. Leziunea tisulară apărută consecutiv acestei agresiuni stimulează eliberarea de factori chemotactici care vor "chema" diferite populații celulare ce vor contribui pe de o parte la eliminarea și neutralizarea agresorilor, iar pe de altă parte, la vindecarea țesutului lezat. În acest scop, celulele granulocitare, mieloide sau limfoide vor elibera local și sistemic numeroase enzime proteolitice, molecule toxice de oxigen și diverse citokine care vor influența funcțiile celulelor epiteliale, musculare, osoase sau ale sistemului imun. În felul



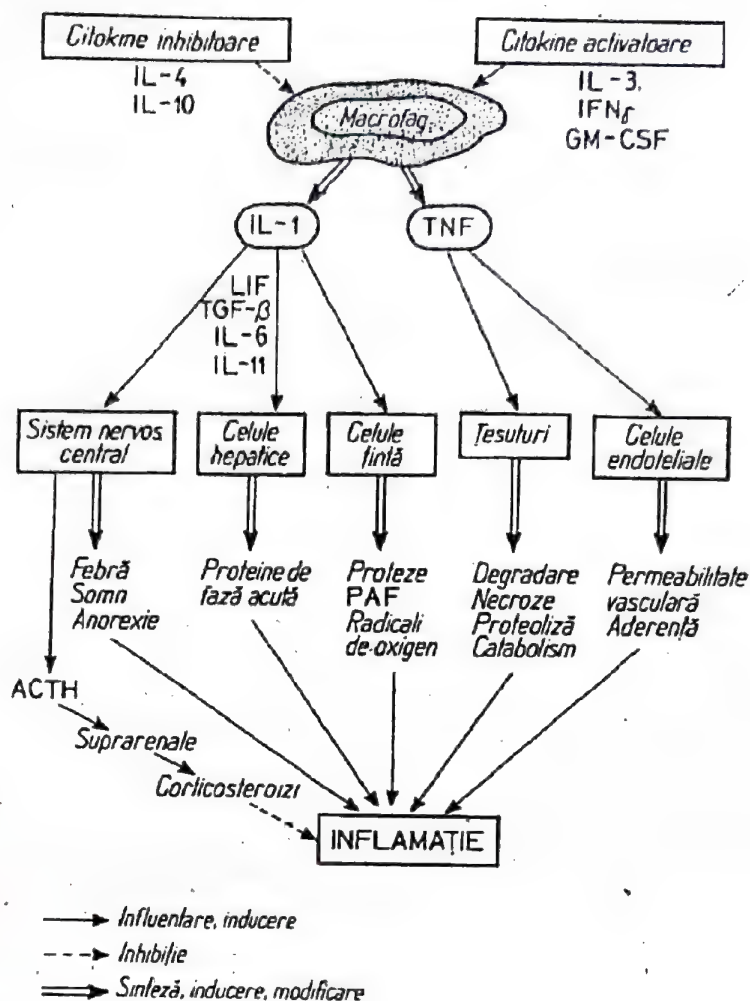


Fig.103. Intervenția diferitelor citokine în declanșarea și controlul procesului inflamator. Unele acționează ca factori inhibitori sau activatori asupra funcțiilor secretorii a macrofagelor, altele acționează asupra altor celule, țesuturi sau sisteme.

acesta se instalează o adevărată rețea funcțională care, prin mesajele transmise sau primite, stimulează procesul inflamator în vederea generării unui "disconfort" pentru agresor și, deci, a neutralizării lui (fig. 103).

Sub acțiunea mediatorilor care induc formarea unor citokine, ca de pildă IL-1 sau TNF, sunt activate unele funcții ale sistemului nervos, țesutului hepatic etc., ce conduc la eliberarea de proteine "inflamatorii" sau la generarea unor perturbări sistemice, cum ar fi febra, somnul etc., cu rol fiziologic bine definit. Unele citokine, ca IFN, IL-3, GM-CSF etc., pot amplifica procesul inflamator, măbind producția mediatorilor implicați direct în inflamație, de genul IL-1, IL-6, IL-8, TNF și alții. Altele, ca de pildă IL-4 sau IL-10, inhibă sinteza și eliberarea acestora.

Deci, și în inflamație, ca și în răspunsul imun specific, există un sistem de reglare și control al reacțiilor de apărare. Mecanismele de acțiune și celulele sau țesuturile țintă ale acestora sunt multiple. De exemplu, IL-1 și TNF $\alpha$  stimulează producerea de PGE<sub>2</sub> de către celulele endoteliale vasculare, fibroblaste, keratinocite, condrocite, macrofage, celulele hipotalamusului etc. La rândul lor, prostaglandinele măresc permeabilitatea vasculară realizată de IL-1, facilitând afluxul celular. Sub acțiunea stimulilor agresionali, monocitele, fibroblastele, celulele endoteliale etc. produc cantități mari de O<sub>2</sub>. Unii mediatorii solubili, cum ar fi IL-1, IL-6, TNF etc., activează M-SOD (mangan-superoxid dismutază), care convertește O<sub>2</sub> în H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,

pentru ca intervenția ulterioară a catalazei să descompună  $H_2O_2$  limitându-se astfel toxicitatea  $H_2O_2$ .

Dar tot IL-1 și TNF activează eliberarea de collagenază de către fibroblaste, celule sinoviale sau condrocite, eliberare care va provoca alterări tisulare grave. Sub acțiunea lor, celulele endoteliale, cu rol cheie în favorizarea aderenței celulare și în realizarea pasajului transvascular al celulelor spre focarele inflamatorii, exprimă intens molecule de adeziune de genul ICAM-1, ELAM-1, VCAM-1 etc.

Interleukina-1, IL-6, IL-8, sau TNF induc sinteza de prostaglandine la diferite niveluri tisulare și eliberarea de către leucocite și macrofage a unor factori pirogeni (care vor genera febră) și sinteza unei proteine S responsabilă de "somnul de fază lentă".

Tot la acest nivel, mediatorii amintiți induc sinteza unui factor de eliberare a corticotropinei (CRF). Acest factor, acționând asupra hipofizei, stimulează sinteza hormonilor adrenocorticoizi (ACTH) care, la rândul lor, vor antrena producerea glucocorticoizilor de către glandele suprarenale ce vor inhiba sinteza unor citokine, blocând reacțiile de apărare imună specifică sau nespecifică. Axul neuro-endocrin, hipofiză → ACTH → suprarenale → glucocorticoizi → depresie funcțională, este declanșat în condiții de stres cu urmările sale benefice sau nocive asupra organismului.

Implicațiile citokinelor în procesele inflamatorii demonstrează o dată în plus că organismul este un tot unitar care are funcții complexe, aflate sub control riguros, control care de fapt realizează homeostazia.

## MARKERII CELULELOR SISTEMULUI IMUN

Termenul de "marker" semnifică un semn particular, o particularitate caracteristică unui grup de celule care permite deosebirea lor de alte celule. Ei pot fi morfologici, funcționali sau antigenici, caracteristici unei populații sau mai multor populații celulare. Pot fi prezenți pe toată durata vieții celulei, sau pot fi exprimați numai în anumite stadii de dezvoltare a ei. De exemplu, capacitatea de aderare la sticlă sau de migrare *in vitro*, caracteristică atât macrofagelor cât și granulocitelor PMN, dar nu și limfocitelor, este un marker pentru primele două tipuri de celule. Limfocitele B neactivate au un reticul endoplasmic slab dezvoltat, pe când cele activate, adică plasmocitele secretoare de imunoglobuline, au reticulul bine dezvoltat. Și markerii antigenici pot fi exprimați într-o anumită perioadă a dezvoltării ontogenice a celulei, pentru a dispărea în alte etape de dezvoltare a ei.

### MARKERI MORFOLOGICI ȘI FUNCȚIONALI

Sunt specifici pentru o singură populație sau pentru mai multe populații celulare (tabelul 71). De exemplu, macrofagele și granulocitele PMN pot fi deosebite de limfocite atât morfologic cât și funcțional prin mărimea celulei, forma nucleului, raportul nucleu/citoplasmă, aspectul marginii celulei (emiterea de pseudopode), migrarea *in vitro*, aderarea la sticlă, funcția fagocitară etc. Dar, există deosebiri și între macrofage și granulocite, sau chiar între diferite populații de granulocite. Astfel, granulocitele PMN au un nucleu segmentat, caracteristic, de unde și denumirea lor de "polimorfonucleare", care le deosebește de



macrofagele cu nucleu rotund. Dar celulele granulocitare se pot deosebi între ele prin caracterele tinctoriale ale granulelor citoplasmatiche, care se colorează galben la neutrofile, roșu la eozinofile și albastru la bazofile.

Tabelul 71

Unii markeri morfologici și funcționali ai celulelor sistemului imun

Markerul	Prezent la nivelul celulelor			
	T	B	M	PMN
Existența nucleului segmentat	-	-	-	+
Granule citoplasmatiche colorate diferit	-	-	-	+
Rețea dezvoltată de cisterne citoplasmatiche	-	+*	-	-
Emitere de pseudopode	-	-	+	+
Funcții fagocitare	-	-	+	+
Prezintă antigenul limfocitelor T	-	+	+	-
Prelucrează antigenul fagocitat	-	-	+	-
Receptori pentru eritrocite de oaie	+	-	-	-
Sinteza de anticorpi	-	+	-	-
Sinteza de TNF	+	+	+	+
Migrarea <i>in vitro</i>	-	-	+	+
Receptori Fc pe suprafața membranei	±	+	+	+
Funcții citotoxice mediate celular	+	-	+	-
Eliberarea de specii active de oxigen	-	-	+	+
Proliferare <i>in vitro</i> la stimul cu PHA	+	-	-	-
Proliferare <i>in vitro</i> la stimul cu PWM	+	+	-	-

\* caracter prezent numai la plasmocite; •

caracter absent (-); slab exprimat (±); bine exprimat (+); PWM = pokeweed mitogen; PHA = fithemaglutinină.

Limfocitele T formează rozete cu hematiile de oaie, putând fi astfel deosebite și separate prin centrifugare în gradient de densitate de celelalte celule ale sistemului imun. Mai mult, pe baza acestui caracter, poate fi identificată subclasa limfocitelor T supresoare ( $CD8^+$ ) cu receptorul E termostabil. Aceste celule își păstrează capacitatea de rozetare E și după incubarea lor timp de o oră la temperatura de  $+45^{\circ}\text{C}$ , tratament în urma căruia limfocitele T ajutoare ( $CD4^+$ ) își pierde receptorul E. Corectitudinea diferențierilor pe baza caracterelor morfologice între diferite celule depinde în mare măsură și de tehnicile și mijloacele folosite în acest scop. De exemplu, examinate la microscopul fonic, limfocitele T și B sunt practic identice din punct de vedere morfologic. Primele observații făcute acum 1-2 decenii la microscopul electronic scanning (SEM) sugerau că limfocitele T ar avea suprafața netedă, iar cele B ar avea numeroase vilozități, care ar putea reprezenta markeri morfologici pentru ele. Ulterior, însă, s-a stabilit că aceste vilozități nu sunt caracteristice celor B ci limfocitelor T și B mature, cele tinere având membrana lipsită total sau parțial de vilozități, în funcție de stadiul

lor de dezvoltare. O diferențiere mai corectă se poate face cu ajutorul microscopului electronic cu transmisie directă (TEM), unde limfocitele *B* inactive au nucleul cu cromatină condensată, citoplasma bogată în ribozomi, raportul nucleu/citoplasmă mic, aparatul Golgi slab dezvoltat, iar reticulul endoplasmatic practic absent. Diferențierea acestora de celulele *T* este totuși discutabilă, dar este absolut sigură în cazul plasmocitelor cu nucleul excentric și cu numeroase cisterne paralele. Dar nu toate subpopulațiile celulare pot fi deosebite între ele pe baza caracterelor lor morfologice sau funcționale, motiv pentru care, în prezent, mijlocul de selecție folosit este cel de identificare a markerilor lor antigenici.

## MARKERI ANTIGENICI

Markerii antigenici sunt componente glicoproteice prezente la nivelul membranei plasmatice a unor celule, dar absente la alte celule. Identificarea lor se face cu ajutorul anticorpilor monoclonali sau prin clonarea moleculară cu stabilirea secvenței genelor care codifică glicoproteinele marker. Au fost identificați determinanți antigenici specifici limfocitelor *T*, limfocitelor *B*, celulelor *NK*, macrofagelor, timocitelor etc., operațiunea de "inventariere" a lor, la care sunt antrenate numeroase laboratoare, continuând și în prezent, motiv pentru care, din doi în doi ani, au loc lucrările congresului internațional asupra "Antigenelor de Diferențiere a Leucocitelor Umane" care analizează rezultatele și standardizează nomenclatura. Conform acestei nomenclaturi, markerii antigenici au denumirea prescurtată CD, inițialele cuvintelor englezești "cluster differentiation" care, traduse cu aproximație în limba română, ar însemna "diferențierea din ciorchine", adică o deosebire a unui caracter dintr-o populație eterogenă de caractere. Tabelul 72 redă antigenele leucocitare umane cunoscute și acceptate la Congresul Internațional asupra Antigenelor de Diferențiere a Leucocitelor Umane care a avut loc la Viena la data de 21-25 II 1989, cu completări ulterioare (1993).

Tabelul 72

### Clasificarea CD a antigenelor leucocitare umane


Marker	Greutate (kD)	Molecula	Proprietăți, tipul de celule pe care este prezent markerul
CD 1a CD 1b CD 1c	49 45 43	gp gp gp	Pe 70-80% din timocitele din corticala timusului, dar nu pe <i>T</i> adulte, pe unele <i>B</i> , pe Langerhans din piele, pe celule dendritice. Sinteza lor este controlată de o grupă de gene (6 gene) care alcătuiesc o parte din familia de supergene imunoglobulinice
CD 2	50	gp	Un lanț monomorfic glicoproteic exprimat pe toate timocitele și limfocitele <i>T</i> (pan <i>T</i> ). Recunoaște moleculele de adeziune LFA-3 (CD58) și este receptor E pentru eritrocitele de oaie. Prezent pe <i>T</i> al om, porc și șoarece, pe unele <i>NK</i> la om. Leagă lectine



Marker	Greutate (kD)	Molecula	Proprietăți, tipul de celule pe care este prezent markerul
CD 3	26 $\gamma$ 20 $\delta$ 20 $\epsilon$ 16 ?	gp	Un complex de 5 lanțuri ( $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ ) asociate receptorului pentru antigen pe limfocitul T. Marker pan T. Leagă lectine
CD 4	59	gp	Glicoproteină pe 25-35% din celulele T periferice. Marker pentru T helper / inductor, receptor pentru o gp de 120 kD de pe celulele infectate cu HIV
CD 5	67	gp	Pan T, pe celule leucemice, pe unele B
CD 6	100	gp	Pan T, pe un subset de B, absent pe NK
CD 7	40	gp	Receptor Fc $\mu$ pe celulele T. Precede pe CD2 în dezvoltarea ontogenică în timus
CD 8	32	gp	Marker pentru celulele T supresor/citotoxice. Pe 25-35% din celulele T periferice. Dimer $\alpha\beta$ sau $\gamma\delta$ . Recunoaște entigenele MHC de clasa I
CD 9	24	p	Pe celule pre-B și B mature. Ar fi antigen de activare, fără restricție la o linie celulară. Prezent și pe monocite.
CD 10	100	p	Endopeptidază neutră, antigen CALLA, comun leucemiei limfoblastice acute pre-B, pre-T și granulocitare (Common acute lymphoblastic leukaemia antigen)
CD 11	180	, gp	- CD11a este lanțul $\alpha$ al LFA-1, pe toate leucocitele
	155	gp	- CD11b este lanțul $\alpha$ al MAC-1. Receptor pentru iC3b prezent pe monocite, granulocite, pe unele subseturi T și B, pe NK
	150	gp	- CD11c este lanțul $\alpha$ al proteinei 150/95 de pe monocite, granulocite, celule NK, trombocite, unele subseturi B
CD 12	90 - 120	gp	Grup de molecule nedefinit, prezent pe celule mieloide și pe trombocite
CD 13	150	gp	Enzima de membrană N-aminopeptidază prezentă pe monocite și granulocite
CD 14	50 - 55	gp	Marker pe monocite
CD 15	?	?	Pe macrofage, granulocite, celule Reed-Sternberg. Slab exprimat pe monocite. Implicat în procesul de fagocitoză, detectează un reziduu antilacto-N-fucose-pentosyl
CD 16	50 - 65	gp	Receptor Fc $\gamma$ III R pentru IgG de pe eozinofile, macrofage, LGL, NK, K, PMN (Din familia FcR: vezi CD7, CD23, CD32)
CDw 17	?	?	Lactosceramida exprimată pe granulocite, monocite, trombocite

Marker	Greutate (kD)	Molecula	Proprietăți, tipul de celule pe care este prezent markerul
CD 18	95	p	Lanțul $\beta$ al subfamiliei moleculelor de adeziune II (LFA-1, Mac-1, p 150/95, CD11a, CD11b, CD11c)
CD 19	95	gp	Un antigen timpuriu pre-B și pan-B exprimat pe mai mult de 95% din celulele leucemice non-mieloide și pe unii precursori mieoizi
CD 20	32 - 37 (33)	p	Pe unele celule pre-B, pe toate celulele B mature, dar nu pe plasmocite. Este o fosfoproteină cu extremitățile NH <sub>2</sub> și COOH implantate în interiorul celulei, molecula având trei regiuni hidrofobe. Antigen cu restricție la populația limfocitară B, implicat în activarea B
CD 21	140	p	Receptor pentru C3d/EBV exprimat pe celulele B în repaus și pe unele celule dendritice reticulare
CD 22	130 - 140	gp	Prezent în citoplasma și membrana celulelor pre-B pe suprafața unor celule B. Omolog unei glicoproteine asociate mielinei (MAG)
CD 23	50	gp	Receptorul Fc $\epsilon$ RII cu slabă afinitate pentru IgE de pe celulele B activate, monocite activate, eozinofile, macrofage, trombocite, celule NK, celule dendritice foliculare, Fc $\epsilon$ RIIa, Fc $\epsilon$ RIIb
CD 24	45	gp	Antigen prezent pe majoritatea celulelor pre-B, limfocitelor B și pe granulocitele din leucemia acută non-mieloidă
CD 25	55	gp	Lanțul $\beta$ al receptorului pentru IL-2 (Tac) de pe celulele T activate, limfocitele B, monocite și eozinofile activate
CDW 26	120	gp	Enzima dimetil-peptidază IV prezentă pe membrana limfocitelor T activate (T200)
CD 27	55	p	Proteină exprimată pe celulele T mature. Dimeri de 50-55 kD și polimeri de 120 kD
CD 28	44	gp	Glicoproteină nepolimorfică implicată în activarea unor subseturi T. Este o moleculă de adeziune care leagă limfocitele T de cele B și componenta de suprafață a unei căi de transducție a semnalului
CD 29	130	p	Subunitatea $\beta_1$ a integrinelor VLA
CD 30	120	gp	Antigen prezent pe celulele T și B activate, pe celulele Reed-Sternberg și pe limfomul histiocitar Ki-1. Puternic exprimat pe celulele tumorale Hodgkin, prezent ca molecule solubile în serul bolnavilor Hodgkin, constituind marker pentru această maladie
CD 31	140	gp	Pe celulele mieloide, endoteliale, pe limfocitele pre-B, pe trombocite, monocite, granulocite, pe unele celule T
CDw 32	40	gp	Receptorul Fc $\gamma$ IIR de pe celulele mieloide monocite, polimorfonucleare, celule B



Marker	Greutate (kD)	Molecula	Proprietăți, tipul de celule pe care este prezent markerul
CD 33	67	gp	Antigen exprimat pe promielocitele din măduva normală și pe monocite
CD 34	105 - 120	gp	Exprimat pe celulele leucemice, limfoblastice și mieloides, pe progenitorii mieloidi, eritrocitari și limfocitari B
CD 35	220	p	O parte din familia receptorilor pentru complement (CR1). Prezent pe granulocite și monocite
CD 36	90	gp	Pe monocite, trombocite, limfocite B, în leucemii mielomonocitare
CD 37	40 - 52	gp	Pe limfocitele B mature, pe precursori B, celulele Kupffer, monocite. Slab exprimat și pe unele limfocite T
CD 38	45	p	Pe limfocitele T activate, pe timocite, plasmocite și precursori B
CD 39	70 - 100	gp	Pe majoritatea limfocitelor B; pe monocite
CD 40	45 - 50	gp	O fosfoproteină pe celulele B mature și imature, pe celulele carcinomatdase, dendritice, pe epiteliul timic. Omologie cu familia NGFR (receptor pentru creșterea nervilor). Anticorpii exercită un efect similar cu BCGF după acțiunea mitogenelor asupra celulelor B. Ligandul pentru CD 40 ar fi o gp 39 de pe celulele T activate
CD 41	?	gp	Pe trombocite și granulocitele PMN. Este complexul II $\beta$ -III $\alpha$ care aparține familiei integrinelor. Leagă trombocitele la fibrină, fibronectină etc.
CD 42 	23	gp	-Prezentă pe trombocite și neutrofile
	23	gp	- Prezentă numai pe trombocite
CD 43	95	gp	Pe limfocitele T, granulocite, monocite, țesut neuronal. Este o leucosialină cu funcții încă necunoscute
CD 44	80 - 95	gp	Molecule puternic glicozilate, larg răspândite (leucocite, creier, hematii), cu funcții insuficient cunoscute. Ar fi molecule de adeziune, receptor pentru acidul hialuronic
CD 45	?	gp	O glicoproteină exprimată exclusiv pe celulele hematopoietice, cu un domeniu citoplasmic mare, de cca. 705 reziduuri de aminoacizi și două subdomenii cu similitudine cu tirozin-fosfataza. Inițial denumită T 200. Este principala tirozin-fosfatază limfocitară
CD 45 RA	220	gp	Pe limfocitele B, pe monocite, granulocite, unele limfocite T
CD 45 RB	?	gp	Pe limfocitele B, unele subsete T, pe monocite, granulocite

Marker	Greutate (kD)	Molecula	Proprietăți, tipul de celule pe care este prezent markerul
CD 45 RO	180	gp	Pe limfocitele B, monocite, granulocite, pe unele celule T, în special pe cele de tip TCR $\gamma \delta$ . Ar fi un marker pentru celulele de memorie
CD 46	65 / 56	gp	Cofactor proteinic de membrană (MCP) prezent pe leucocite
CD 47	45 - 52	gp	Marker cu o largă răspândire: pe toate celulele hematopoietice, pe celulele epiteliale, endoteliale, pe fibroblaste, celule tumorale etc.
CD 48	41	gp	Pe leucocite
CDw 49b	165	gp	Lanțul $\alpha_2$ al VLA, prezent pe trombocite, limfocitele T etc.
CDw 49d	150	gp	Lanțul $\alpha_4$ VLA. Pe limfocite T, B, monocite, timocite
CDw 49e	?	?	Lanțul $\alpha_5$ al VLA
CDw 49f	120	gp	Lanțul $\alpha_6$ VLA pe limfocitele T, trombocite
CDw 50	148 / 108	gp	Pe leucocite, timocite, limfocite T
CD 51	125	gp	Lanțul $\alpha$ VNR pe trombocite (al integrinelor)
CDw52	21 - 28	gp	Pe leucocite, dar în special pe limfocite și pe monocite
CD 53	32 - 40	gp	Pe leucocite
CD 54	80 - 114	gp	Marker cu răspândire largă. Ar fi ICAM-1 de la nivelul celulelor activate, celulelor epiteliale, tumorale etc.
CD 55	?	?	Factorul DAF (decay accelerating factor) de "accelerare a degradării" celulare
CD 56	220 - 135	gp	Prezent pe limfocitele activate, pe celulele NK. Este factorul NKH-1 izoform lui N-CAM
CD 57	110	gp	Este HNK-1 de pe celulele NK, limfocitele T citotoxice, unele subseturi de limfocite B, creier
CD 58	40 - 65	gp	LFA-3 de pe leucocite, celule epiteliale. Este o moleculă legată la fosfatidil-inozitol (PI)
CD 59	18 - 20	gp	O moleculă legată la fosfatidil-inozitol, larg răspândită (probabil un factor de restricție a fracțiunilor C7 și C8 ale complementului). Poate fi detașată de PI de către fosfolipaza C (PLC) specifică PI
CDw 60	?	?	Grupul NeuAc-NeuAc-Gal (diasolyl galactozoterminal) pe limfocitele T ajutătoare și T citotoxice
CD 61	105	gp	Lanțul $\beta_3$ al integrinelor
CD 62	140	gp	GMP-140 pe trombocite, granulocite PMN, monocite, celule endoteliale. Fixează PMN și monocitele la țesuturile lezate
CD 63	53	gp	Puternic exprimat pe trombocite, monocite; slab exprimat pe limfocitele T și B și pe granulocite



Marker	Greutate (kD)	Molecula	Proprietăți, tipul de celule pe care este prezent markerul
CD 64	75	gp	Receptorul $Fc\gamma R1$ de pe monocite
CD 65	?	?	Ceramide-dodecazaharid pe granulocite și monocite
CD 66	180 - 200	fp	O fosfoproteină puternic exprimată pe granulocite după activarea lor
CD 67	100	p	Prezent pe trombocite și granulocite
CD 68	110	gp	Cel mai fidel marker imunohistologic de pe macrofage
CD 69	32 / 28	gp	Antigene exprimate pe membrana limfocitelor <i>T</i> și <i>B</i> în primele momente după activare
CDw 70	50 / 75 / 95 / 110 / 170	?	Markeri cu diferite greutăți moleculare exprimat pe limfocitele <i>T</i> și <i>B</i> activate, pe celulele Reed-Sternberg
CD 71	?	?	Receptorul pentru transferină este bine exprimat pe toate celulele care se multiplică activ
CD 72	43 / 39	gp	Un marker pan- <i>B</i> exprimat în stadii foarte timpurii de activare și diferențiere a acestora
CD 73	69	p	Enzima ecto-5'-nucleotidază asociată structurilor de membrană a unor subpopulații de limfocite <i>T</i> și <i>B</i>
CD 74	41 / 35 / 33	?	Molecule care recunosc lanțul invariabil (Li) asociat la MHC clasa II, prezent pe toate celulele <i>B</i> și pe unele subpopulații de monocite
CDw 75	53 ?	p	Molecule exprimate pe celulele <i>B</i> normale, activate sau transformate neoplazic (limfomul Burkitt). Reacționează cu glicosfingolipidele
CD 76	85 / 67	gp	Exprimat pe limfocitele <i>B</i> mature și pe unele limfocite <i>T</i>
CD 77	?	?	Globosylceramida exprimată pe limfocitele <i>B</i> nestimulate
CDw 78	?	?	Bine exprimat pe limfocitele <i>B</i> , slab pe monocite
CD 79 a	33,40	gp	Lanțul $\alpha$ al imunoglobulinei Pe limfocitul <i>B</i>
CD 79 b	33,40	gp	B29
CD 80	60	gp	B7 pe limfocitul <i>B</i>
CD 81	22	?	Pe celulele <i>B</i>
CD 82	50-53	?	Pe limfocitele <i>B</i>
CD 88	42	gp	Receptorul C5a pe celulele mieloide
CD 89	55-75	gp	$Fc\alpha R$ de pe celulele mieloide
CD 90	25-35	gp	Antigenul Thy-1 pe timocite
CD 102	60	?	Molecula de adeziune ICAM-2
CD 104	220	p	Lanțul 4 al integrinelor
CD 106	100-110	p	VCAM-1 (vascular cell adhesion molecules) de pe celulele endoteliale

Marker	Greutate (kD)	Molecula	Proprietăți, tipul de celule pe care este prezent markerul
CDw119	90	p	Receptor pentru IFN $\gamma$
CD 120 a	55	p	Receptor pentru TNF
CD 120 b	75	p	Receptor pentru TNF
CD 121 a	80	?	Receptorul de tip I pentru IL-1
CD 121 b	68	?	Receptorul de tip II pentru IL-1
CD 122	75	?	Receptorul pentru IL-2 (IL-2R $\beta$ )
CDw 124	140	gp	Receptorul pentru IL-4
CD 126	80	gp	Receptorul pentru IL-6
CDw 127	75	gp	Receptorul pentru IL-7
CDw 128	58-67	gp	Receptorul pentru IL-8
CDw 130	130	gp	Glicoproteina 130 SIG, receptor pentru IL-6

Legendă : FcR = receptori pentru Fc; FN = fibronectină; LFA = lymphocyte function associated (funcție asociată limfocitelor); LGL = large granular lymphocytes (limfocite granulare mari); MAG = myelin associated glycoprotein (glicoproteină asociată mielinei); NGF = neuronal growth factor (factorul de creștere a neuronilor); NK = natural killer (celule naturale ucigașe); VLA = very late activation (activare foarte târzie); VNA = vitronectin antigen; w = caracteristici insuficient cunoscute; 180 - 200 = markerul are greutatea moleculară care variază între 180 și 200 kD; 50 / 75 / 93 etc. = markerul se poate găsi sub diferite stări de agregare moleculară cu greutate variind de la o formă de polimerizare la alta.

Unii dintre markerii antigenici enumerați, ca de pildă CD44, CD54, CD58 etc., pot fi exprimați pe suprafața mai multor populații de celule, pe când alții, numai pe o singură populație sau chiar pe un grup restrâns de celule (tabelul 73).

Tabelul 73

**Exemple de markeri antigenici cu specificitate la o populație sau un număr restrâns de populații celulare**

Celule pe care este exprimat markerul	Markerul exprimat
Limfocite T	CD1 (a, b, c), CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD26, CD27, CD28 etc.
Limfocite B	CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD40, CD72, CD73, CD74, CDw75, CD76
Celule NK	CD48, CDw50, CD53, CD56, CD57
Celule mieloid	CD13, CD14, CD15, CD64, CDw65, CD66, CD67, CD68
Trombocite și alte celule	CD9, CDw17, CD29, CD31, CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD47, CDw49b, CDw49d, CDw49f, CD51, CD55, CD61, CD62, CD63

Majoritatea lor sunt glicoproteine sau proteine cu diferite funcții, dintre care multe au rol în transmiterea intracelulară a diferitelor semnale. De exemplu,



markerul 73 (și posibil și 75) este enzima ecto-5'-NT ancorată la nivelul membranei printr-un glicozil-fosfatidil-inozitol și are un rol în maturarea funcțională și proliferarea spontană a limfocitelor *B*, controlând tranziția de la faza de multiplicare  $G_0$  la faza  $G_1$ . Unii au diferiți epitopi funcționali, ca de pildă CD2, sau antigenici, ca CD4, alții, cum ar fi CD20, au domenii hidrofobe sugerând o structură trans-membranară similară canalelor ionice etc.

#### MODULAȚIA MARKERILOR ANTIGENICI DE LA NIVELUL MEMBRANEI CELULARE

Prin modulația antigenică se înțelege alternanța dintre exprimare și lipsa de exprimare a unui antigen de pe suprafața celulei în diferite momente de existență a acesteia. Cu alte cuvinte, un antigen exprimat pe membrana plasmatică poate să dispară, pentru ca după un anumit timp să reapară, fenomenul putând fi evidențiat cu ajutorul anticorpilor care "văd" antigenul respectiv. Expresia antigenelor pe suprafața limfocitelor poate fi modificată în relație fie cu diferite momente ale maturării celulei, fie în funcție de diferitele influențe pe care aceasta le suportă. Ca atare, antigenele de membrană, deși sunt stabile, nu trebuie considerate inerte sau fixe, deoarece exprimarea lor poate varia atât calitativ cât și cantitativ. Cauzele care generează și condiționează modularea antigenică sunt multiple și încă insuficient cunoscute. În linii mari ele sunt *fiziologice*, *induse* accidental sau deliberat, și *patologice*. Fiziologic, modulația antigenică însoțește diferențierea celulelor în cursul maturării lor, în anumite stadii de dezvoltare celulele exprimă unii markeri antigenici pentru ca în altele să nu-i mai exprime. La om de exemplu, în cursul maturării lor, limfocitele *T* exprimă inițial CD2, un marker al întregii populații de celule *T*. În stadii mai avansate, se exprimă secvențial markerii CD3, CD4, CD8, CD5, CD1, celulele fiind deci  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD5^+$ ,  $CD1^+$  pentru ca, odată ajunse la maturitatea funcțională, unele subpopulații să fie  $CD2^+$ ,  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ , adică limfocitele *T*<sub>h</sub>, iar altele,  $CD2^+$ ,  $CD3^+$ ,  $CD8^+$ , adică celulele *T* supresoare / citotoxice (tabelul 74).

Dar modulația antigenică poate fi și cantitativă, nu numai calitativă. De exemplu, limfocitele de bou exprimă dens aloantigenul detectabil cu anticorpii T80 atunci când sunt încă în timus dar, după maturarea lor, o parte din celule, deși sunt  $T80^+$ , exprimă totuși slab acest marker.

Dintre cauzele induse pot fi amintite cele provocate de terapia cu antiseruri (cauze antigenice) sau cele provocate de diverse medicamente (cauze farmacologice). De regulă, la persoane cărora li s-au grefat organe sau celule, ca de pildă în transplantul renal, se administrează anticorpi anti-CD3 pentru a întârzia rejecția organului prin blocarea funcțională a limfocitelor *T*. După un asemenea tratament, limfocitele pacienților exprimă pe membrana lor plasmatică toate antigenele cu excepția celui pan-*T* (CD3) care a dispărut. Dacă se întrerupe administrarea anticorpilor, sau dacă limfocitele sunt cultivate *in vitro*, după 7-8 zile markerul CD3 re apare. Limfocitele  $TL^+$  (*T* leukaemia sau antigenul pentru limfocitele *T* leucemice sau timocitele *T* imature), sau limfocitele *B* care exprimă pe membrană molecule de imunoglobulină, dacă sunt inoculate la animale care au fost imunizate anti-*TL* sau anti-imunoglobulină, își pierd reversibil antigenele respective. Dintre agenții farmacologici responsabili de modulația antigenică, mai cunoscuți sunt hormonii timici, cAMP, prostaglandinele, care pot mări exprimarea aloantigenului Thyl la șoarece sau pot induce apariția lui pe celulele Thyl

din măduva osoasă etc. Dimpotrivă, indometacinul, un inhibitor al cAMP, descrește exprimarea aloantigenului Thy-1.

Tabelul 74

**Diferențe antigenice între limfocitele T naive (incompetente )  
și de memorie (competente imunologic)  
(după A. N. Akbar și col.)**

Markerul antigenic	Limfocite T	
	Naive	De memorie
CD 2	++	+++
CD 7	++	±
CD18 / CD11a (LFA-1)	++	+++
CD 25 (IL-2 R)	-	+
CD 26	-	+
CD 29	+	+++
CD 44 (Pgp-1)	+	+++
CD 45 RA	+++	-
CD 45 RO	-	+++
CD 54 (ICAM-1)	-	+
CD 58 (LFA-3)	+	++
MHC clasa II	-	+
p 75 (în IL-2 R)	-	±

Deci, modulația antigenică este un fenomen reversibil, dependent în primul rând de metabolismul celular. În afară de cauzele normale sau induse, modulația este observată în unele situații patologice cum ar fi hepatita cronică activă, miastenia gravis, diverse imunodeficiente congenitale, când limfocitele pot pierde sau pot exprima mai mulți markeri antigenici decât exprimă în mod normal. De exemplu, pe aceeași celulă T sunt exprimate aloantigenele CD4 și CD8 care, în mod normal, se găsesc pe subpopulații de celule diferite, respectiv pe Th și Tc/s.

Modulația antigenică poate fi salutară sau poate avea efecte nedorite. Este salutară în cazul unor autoagresiuni, când unele limfocite devin reactive față de unele antigene exprimate pe alte limfocite sau celule din componența organismului propriu. Dacă însă aceste celule "țintă" își "ascund" antigenele, limfocitele agresoare nu le mai recunosc ca țintă și procesul autoagresiv nu mai are loc.

Dar, în cazul unor leucemii sau al altor boli în care celulele unui țesut exprimă antigene de neoformație, de exemplu antigene tumorale, terapia cu anticorpi devine inefficientă, deoarece aceste antigene sunt modulate, dispar, celula devenind indiferentă la acțiunea terapeutică a anticorpilor.



## MOLECULE DE ADEZIUNE

În relațiile dintre celulă și diferite componente străine, un rol esențial revine atât unor caracteristici particulare ale unor componente străine de celulă, cunoscute sub denumirea de "liganzi", cât și complexelor moleculare de pe suprafața membranei plasmactice care recunosc liganzii. De altfel, distincția dintre liganzi și moleculele care îi recunosc este relativă, deoarece un ligand de pe o celulă poate fi receptor pentru o structură exprimată pe altă celulă și care poate funcționa ca moleculă de adeziune. Tot ceea ce este recunoscut și fixat pe membrana unei celule este "ligand". Este cazul antigenelor, lectinelor, hormonilor, fibronectinei (FN), lamininei (LM), collagenului etc. Complexele moleculare care recunosc liganzii ar putea fi împărțite în două mari grupe: a) molecule de adeziune și b) receptori de membrană.

**Fibronectina (FN)** reprezintă o subfamilie de molecule formată din subunități polipeptidice distincte, existente ca dimer sub diferite variante, în plasmă, placenta, lichid amniotic și pe suprafața unor celule. FN din plasmă are un "segment de conexiune" cu un situs de atașare care interacționează cu moleculele de adeziune din familia integrinelor ( $\alpha 4 \beta 1$ ), fiind distincte de tripeptidul Arg-Gly-Asp (RGD) recunoscut de integrina  $\alpha 5 \beta 1$  (fig. 104).

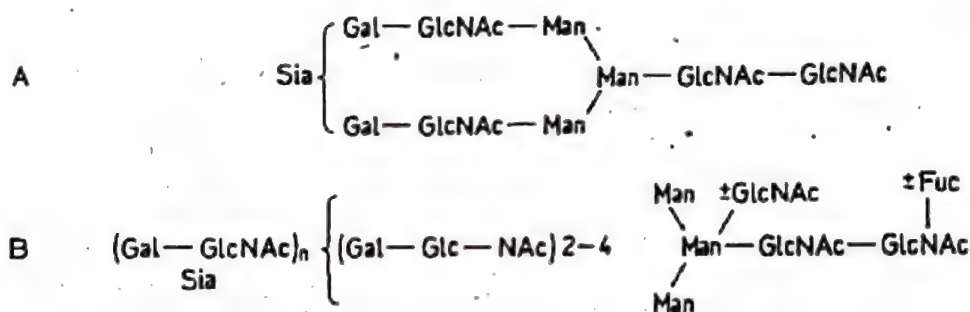


Fig.104. Structura chimică a fibronectinei existentă în plasmă (A) și în placenta sau în lichidul amniotic (B).

**Laminina (LM)** este un component ubicitar al membranelor celulare, în special al celor tumorale, cu trei lanțuri polipeptidice (A, B<sub>1</sub> și B<sub>2</sub>) a căror exprimare diferențiată creează izoforme moleculare multiple (fig. 105). Este recunoscută de integrinele VLA-1, VLA-3 și VLA-6.

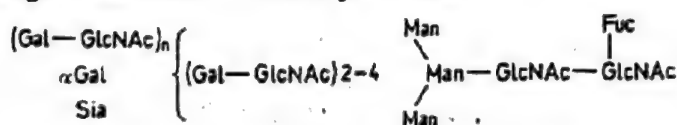


Fig.105. Structura chimică a moleculei de laminină.

Moleculele de adeziune sunt exprimate pe suprafața celulelor care mediază selectiv procesele de legare a unor substraturi la membrana celulară sau de aderarea intercelulară, deosebindu-se din acest punct de vedere de receptori care mediază legarea, ei recunoscând alte structuri și nefiind recunoscuți ei de acestea.

Până în prezent sunt cunoscute trei familii de molecule de adeziune, și anume: a) imunoglobulinele, b) integrinele și c) selectinele (tabelul 75). Acestea sunt implicate în interacțiuni de genul celulă-celulă, celulă-moleculă sau celulă-matrice celulară (FN, LM collagen). Angajarea în aceste interacțiuni a suprafeței celulare duce la transmiterea semnalelor primite și la declanșarea unor evenimente care pot modifica fenotipul, exprimarea produselor unor gene, starea de activare sau mobilitatea celulei etc.

Tabelul 75

Familiiile și subfamiliiile moleculelor de adeziune: funcții și substraturi la care aderă (după R.E. Hemler)

Familia	Subfamilia	Există pe	Membri	Subunități	Aderă la
Integrine	I (VLA)	Numeroase populații celulare	VLA-1	$\alpha 1\beta 1$	LM, Co
			VLA-2	$\alpha 2\beta 1$	LM, Co
			VLA-3	$\alpha 3\beta 1$	LM, Co, FN
			VLA-4	$\alpha 4\beta 1$	FN, p-HEV
			VLA-5	$\alpha 5\beta 1$	FN
			VLA-6	$\alpha 6\beta 1$	LM
	II (LAF)	Leucocite	LFA-1	$\alpha L\beta 2$	ICAM-1, ICAM-2
			Mac-1	$\alpha M\beta 2$	Fx, IC3b, LPS, FB
			p150.95	$\alpha X\beta 2$	IC3b
	III (citoadezine)	Trombocite, celule endoteliale	IIb-IIIa VNR	$\alpha B\beta 3$ $\alpha v\beta 3$	FN, FB VN, FB, TSP
		Celule canceroase	VNR ALT	$\alpha v\beta 5$	VN, FN, RGD
Selectine		Numeroase populații celulare	PADG-EM ELAM-1 LAM-1 Mel-14	(P-selectine) (E-selectine) (L-selectine) (L-selectine)	Trombocite Cel. endot. Leucocite Leucocite
Imunoglobuline	TCR	Limfocite T	$\alpha, \beta (\gamma\delta)$	-	Antigene
	slg	Limfocite B	$\mu, \delta, \epsilon, \gamma, \alpha$	-	Antigene
	CD2	Limfocite T	-	-	LFA-3
	LFA-3	Celule APC	-	-	CD2

Abrevieri: APC=celule prezentatoare de antigen; ELA=endothelial cell adhesion molecule (moleculă de adeziune la celule endoteliale); FB=fibrinogen; FN=fibronectină; FX=factor X; GMP=granule membrane protein (proteină granulară de membrană); ICAM=molecule de adeziune intercelulară (intercellular adhesion molecule); LAM=leukocyte adhesion molecule (molecule de adeziune a leucocitelor); LFA=lymphocyte function associated (asociat funcției leucocitare); LM=laminină; Mel=moleculă de adeziune celulară; PADG-EM=platelet activation-dependent granule external membrane protein (activator al trombocitelor, dependent de proteina granulară de membrană); p-HEV=Peyer patch-Human Endothelial Venules (celule endoteliale ale venulelor din plăcile Peyer); slg=imunoglobulină de suprafață (receptor de membrană de natură imuno-globulinică); RGD=Arg-Gly-Asp; TCR=T cell receptor (receptor pentru antigen pe limfocitele T); VLA=very late activation (activare foarte târzie); VN=vitronectină; VNR=vitronectin receptor (receptor pentru vitronectină).

Notă: VLA-4 este intens exprimată pe limfocitele T, mediind semnale implicate în proliferarea acestora și acumularea de cAMP.



Aceste evenimente reglează activitatea funcțională și implicit exprimarea moleculelor de adeziune sau a receptorilor de membrană, dintre care unii, ca de pildă receptorii Fc sunt implicați în evenimentele de aderare.

**Imunoglobulinele** există fie ca molecule integrate în membrana limfocitelor B cu funcție de receptori pentru antigene, fie ca molecule solubile prezente în plasmă și în umorile organismului, care se fixează prin Fab la suprafața unor celule țintă și prin Fc la receptorii Fc de pe membrana unor celule efectoare (fig. 106). Prin realizarea conjugatelor țintă-efector, sunt activate mecanismele litice anti-corp-dependente sau funcțiile fagocitare ale macrofagelor (fagocitoză "opsonică").

O caracteristică principală a moleculelor de adeziune este modul de alcătuire a lor: toate sunt dimeri formați din lanțurile H+L în cazul imunoglobulinelor sau din lanțurile  $\alpha+\beta$  în cel al integrinelor sau selectinelor.

**Integrinele** sunt o familie larg răspândită, alcătuită din cel puțin 14 heterodimeri  $\alpha\beta$  împărțiți în trei subfamilii distincte: a) subfamilia  $\beta 1$  conține cel puțin 6-8 membri (VLA 1-6); b) subfamilia  $\beta 2$  cu trei membri (LFA-1, Mac-1 și pl 50,95) și c), cu subfamilia  $\beta 3$  sau a "citoadezinelor" care are minimum doi membri. Aceste molecule existau la formele primare de viață și s-au păstrat nemodificate în cursul evoluției filogenetice. Și în prezent ele există la *Drosophylla*, nematode, pești, păsări și bineînțeles la mamifere la care sunt exprimate pe celulele embrionare, cartilaje, celulele endoteliilor vasculare, pe leucocite, trombocite etc. Sunt glicoproteine de suprafață care, în prezența ionilor bivalenți, a temperaturii corespunzătoare și a microfilamentelor membranare, mediază adeziunea la fibronectină, laminină, glicolipide, glicoproteine etc. la care recunosc, printre altele, un segment comun din constituția polipeptidelor cu secvența Arg-Gly-Asp (RGD). Greutatea lor moleculară variază între 95 și 200 kD, în cadrul familiei existând 8-9 subunități  $\alpha$  și 4-5 subunități  $\beta$  care, după modul în care este implicat lanțul, realizează cele trei subfamilii menționate anterior (v. tabelul 75). Toate subunitățile  $\alpha$  au un domeniu citoplasmatic foarte scurt, cu 15-53 de reziduuri de

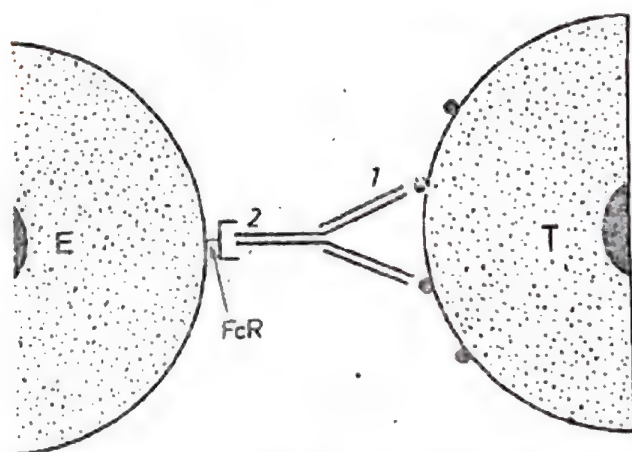


Fig. 106. Modalități de fixare a imunoglobulinelor la diferite celule. Prin Fab (1) molecula recunoaște specific antigenele de pe celula țintă (T), realizând o fixare "imună". Prin Fc (2) se leagă "citofili" la receptorul pentru Fc (FcR) de pe celula efectoare (E). În acest mod, se poate forma o "punte" între celulele T și E, cu activarea potențialului citotoxic al celulei efectoare E.

aminoacizi și unul extracelular lung (1050 de reziduuri) conținând 18-24 Cys care realizează legături disulfidice intralanț și numeroase bucle mici. Domeniul extracelular al lanțului  $\beta$  este ceva mai scurt (667 aminoacizi), dar cu mai multe reziduuri Cy (56) și, deci, cu un număr mai mare de legături disulfidice, care-i conferă un înalt grad de rigiditate. Pentru exprimarea integrinelor la suprafața celulelor, este obligatorie asocierea celor două subunități  $\alpha$  și  $\beta$ , a căror sinteză este controlată de gene situate pe cromozomi diferiți (tabelul 76).

Tabelul 76

**Greutatea moleculară și poziția genelor care controlează  
sinteza subunităților familiei de integrine**

Subunitățile $\alpha$	Greutatea moleculii (kD)	Gena este cromozomul	Subunitățile $\beta$	Greutatea moleculii (kD)	Gena este cromozomul
1	210	5	1	130	10
2	165	5	2	95	21
3	130	17	3	105	17
4	150	?	4	220	?
5	135	12	5	110	?
6	120	?			
1	180	16			
M	170	16			
X	150	16			
V	125	2			
B	120	17			

Moleculele aceleiași subfamilii pot fi exprimate diferențiat pe celule, în funcție de tipul, vârsta sau starea de activare a acestora (tabelul 77). Importante pentru realizarea contactelor intercelulare și declanșarea unor reacții imune sunt integrinele subfamiliei II alcătuite din trei grupe de glicoproteine înrudite structural: LFA-1 (CD 11a / CD18), Mac-1 (CD11 b / CD 18) și p 150, 95 (CD11 c / CD18). Ele mediază aderarea limfocitelor la diferite ținte sau substraturi, interacția fagocitelor cu microbii opsonizați prin anticorp sau complement etc. Toate se compun din două lanțuri polipeptidice legate necovalent: o subunitate  $\alpha$  unică (CD 11a-c) și alta comună  $\beta$  (CD18). Genele care codifică pentru lanțul  $\alpha$  ale acestei subfamilii sunt situate pe brațul scurt al cromozomului 16.

Tabelul 77

**Intensitatea exprimării moleculelor de adeziune din subfamilia I  
a integrinelor pe suprafața unor celule**

Celula care exprimă moleculele de adeziune	Moleculele de adeziune exprimate	Intensitatea exprimării
Timocite	VLA - 1;2;3;5 VLA - 4 VLA - 6	Cantități neglijabile Bine exprimat Slab exprimat
Limfocite T	VLA - 1;2 VLA - 3 VLA - 4 VLA - 5;6	Foarte slab exprimat Slab exprimat Moderat exprimat Bine exprimat



Celula care exprimă moleculele de adeziune	Moleculele de adeziune exprimate	Intensitatea exprimării
Limfocite <i>T</i> activate	VLA - 1;2 VLA - 3 VLA - 4 VLA - 5;6	Bine exprimat Slab exprimat Moderat exprimat Bine exprimat
Monocite	VLA - 1;3 VLA - 2;4;5 VLA - 6	Slab exprimat Moderat exprimat Prezomină
Trombocite	VLA - 1;3;4 VLA - 5 VLA - 2;6	Nedetectabil Slab exprimat Moderat exprimat

LFA-1 recunoaște ICAM-1 sau ICAM-2, molecule larg răspândite și inductibile prin citokine inflamatorii. Prin structură, LFA-1 aparține familiei integrinelor dar, spre deosebire de alte integrine, această moleculă este exprimată predominant pe leucocite. Aderarea la liganzi este condiționată de temperatură, energie, prezența cationilor bivalenți (în special  $Mg^{2+}$ ) și existența unui citoschelet celular intact.

Ar exista două forme moleculare, una inactivă și alta activă. Leucocitele proaspăt izolate, deși exprimă mult LFA-1 și ICAM-1, nu autoaglutinează pentru că moleculele LFA-1 sunt inactivă. Tratarea cu anticorpi anti LFA-1 (NK1-L16) sau cu PMA (forbol miristat-acetat), care alterează conformația moleculei de adeziune ca urmare a fosforilării lanțului  $\beta$ , le transformă în molecule active. LFA-1 realizează un contact specific cu ICAM-1 sau ICAM-2 de pe țintă, după care urmează recunoașterea specifică a antigenului de către receptorul pentru antigen. Dacă celula, de pildă cea citotoxică, nu recunoaște specific antigenul prin complexul TCR-CD3, atunci legătura LFA-1 cu ICAM se desface și celula *T* c se desprinde de pe țintă. Dacă însă legătura specifică are loc, atunci complexul CD3 transmite semnale activatoare la LFA-1 care vor conduce la fosforilarea subunității  $\beta 2$  și la medierea unor legături de mare afinitate (fig. 107). Interacțiunile LFA-1 cu ligandul pot fi reglate prin trei modalități diferite: a) prin creșterea sau scăderea numărului de molecule de adeziune exprimate pe suprafața celulei; b) prin maturarea proceselor de activare a acestor molecule și c) prin activarea specifică a LFA-1.

În reglarea activității funcționale a LFA-1 un rol important are legarea TCR la epitop, proces în care, ca urmare a semnalelor induse intracelular, crește aviditatea LFA-1. Deci, adeziunea realizată de LFA favorizează recunoașterea antigenului de către TCR care, la rândul său, va stimula aviditatea LFA-1, astfel încât limfocitele *T* inactive, care exprimă molecule LFA-1 de joasă aviditate, odată activate, vor exprima molecule de mare aviditate. Întregul proces favorizează aderarea limfocitelor *T* la endotelii, proliferarea lor, activarea limfocitelor *B* via limfocite *T* etc.

*Mac-1* (*CR3*, *iC3b receptor*) este un marker pentru celulele mieloide format dintr-o subunitate  $\alpha$  de 170 kD și una  $\beta$  de 95 kD identică celor de la LFA-1 și p 150,95. Exprimată pe macrofag, recunoaște FB, iC3b, un polipeptid de pe suprafața celulelor endoteliale care ar facilita aderarea granulocitelor PMN și



extravazarea lor în timpul proceselor inflamatorii, precum și o glicoproteină de 63 kD de pe suprafața *Leishmaniei*. Pentru legarea acestora, este necesară prezența  $\text{Ca}^{2+}$  sau  $\text{Mg}^{2+}$ .

p. 150,95, exprimată pe macrofage, limfocite *T* citotoxice și probabil pe alte subpopulații *T*, este un receptor pentru complement care leagă iC3b. Favorizează aderența neutrofililor și monocitelor la endotelii, formarea conjugatelor limfocite *Tc* - celulă țintă, chemotactismul și fagocitoza celulelor înzestrate cu această funcție. Toate aceste trei populații moleculare realizează două funcții majore: a) adeziunea intercelulară; b) transducerea semnalelor de la exterior spre interiorul celulei.

Integrinele intervin în relațiile dintre celulele mobile și cele fixe endoteliale. Ele sunt atât pe suprafața celulelor normale, ca de pildă pe limfocite, cât și pe suprafața celulelor tumorale, în curs de metastazare, ambele populații celulare având unele caracteristici comune, cum ar fi capacitatea de deplasare, de proliferare și de aderență. Celulele tumorale exprimă diferiți membri ai familiilor de integrine care ar fi implicați în aderența lor la țesuturile normale și, deci, în procesul de metastazare.

Acest proces este similar cu cel de "homing" al precursorilor limfocitari, celula tumorală preferând un anumit loc pentru aderență și colonizare, fapt care sugerează existența la nivelul lor a unor receptori pentru "homing". Un astfel de receptor ar fi o proteină de 85 kD numită CD44, prezentă atât la limfocite cât și la suprafața celulelor tumorale, indiferent de caracterul lor de metastazare.

**Selectinele** sunt o familie de glicoproteine de adeziune, alcătuită din molecule *L* exprimate pe leucocite, *E* pe celulele endoteliale și *P* pe trombocite și celulele endoteliale. Se leagă prin oligozaharide la receptori pentru ele fiind implicate în evenimentele timpurii ale răspunsului inflamator acut când realizează interacțiuni de aderență inițială a leucocitelor la endoteliul vascular (vezi fig. 37). Într-un stadiu ulterior, sunt recrutate *b* integrinele *CD11/CD18* și *ICAM1/ICAM2* care realizează interacțiuni adezive ferme cu rol în asigurarea migrării leucocitelor în ariile extravasculare. Ar mai interveni în orientarea limfocitelor spre ariile lor de la nivelul organelor limfoide secundare, adică spre "domiciliul" lor (homing). Numele derivă de la termenii "select" (a selecționa, a alege) și "lectine". Moleculele au un domeniu  $\text{NH}_2$  terminal cu 117-120 de reziduuri de aminoacizi, analog cu lectinele de tip C, dintre cele mai bine cunoscute fiind GMP-140 (CD 62), LAM-1, Mel-14, PAGD-EM și ELAM-1.

**Selectina GMP-140**, exprimată pe trombocite și pe celulele endoteliale asigură legarea monocitelor și granulocitelor PMN la țesuturile lezate. Moleculele au un segment extracelular cu un domeniu lectinic LAM-1, un receptor "pentru acasă" (homing), care asigură aderența leucocitelor la endoteliile vasculare din ganglionii limfatici, splină etc. precum și migrarea PMN la locul inflamației.

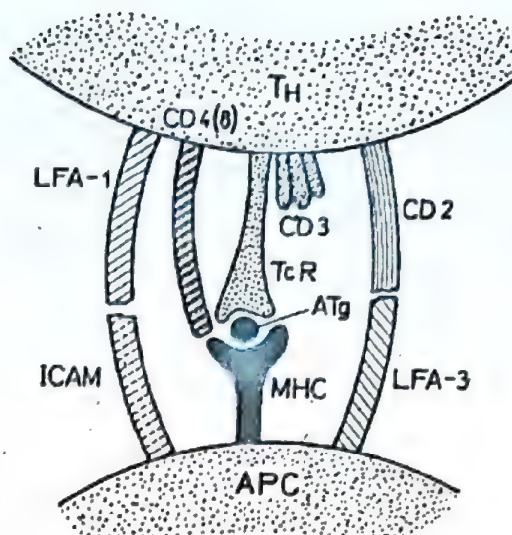


Fig.107. Stabilirea de conexiuni între celula prezentatoare de antigen (APC) și limfocitul *T* (*Th*). Celula APC prezintă antigenul (Atg), care este recunoscut specific de către receptorul pentru antigen (*TcR*) al celulei *T*. Prin *CD4* sau *CD8*, limfocitul *T* recunoaște antigenul complexului major de histocompatibilitate (*MHC*) ale APC, iar prin *LFA-1* și *CD2*, fixează *ICAM-1* (sau *ICAM-2*), respectiv *LFA3* ale APC.



Mel-14 acționează foarte timpuriu în adeziunea granulocitelor PMN la endoteliu, PAGD-EM, asigură interacțiunea celulă-celulă necesitând însă un ligand intermediar (*trombospondina*). Tot în acest grup este inclus și ELAM-1, sintetizat de celulele endoteliale ca răspuns la agenții inflamatori. Structura moleculei de ELAM-1 diferă de la un tip la altul. De exemplu, anticorpii care recunosc ELAM-1 de pe membrana celulelor NK nu recunosc aceleași molecule de pe suprafața granulocitelor.

Din punct de vedere funcțional, moleculele de adeziune controlează morfogeneza celulară, adeziunea celulelor la diferite substraturi și vindecarea rănilor, absența lor generând grave alterări ale stării de sănătate.

Există persoane cu deficit congenital de aderare a leucocitelor (LAD=leukocyte adhesion deficiency). Defectul este la nivelul genei care controlează sinteza lanțului  $\alpha$ , astfel că nu se mai pot forma molecule de  $\beta 2$ -integrine (LFA-1 și Mac-1). Clinic, acest deficit se exprimă prin leucocitoză, mobilizarea deficitară a granulocitelor PMN, infecții recurente, vindecări întârziate ale rănilor etc., provocate de profunde modificări ale chemotaxiei PMN și monocitelor, ale aderenței la substrat, ale funcțiilor lor fagocitare etc. Locomoția granulocitelor PMN este dependentă de LAF-1, Mac-1, p150,95. Persoanele la care aceste molecule lipsesc au granulocite PMN care pot migra normal în gel de collagen, dar nu pot traversa suprafețele bidimensionale.

De aici concluzia că procesul contractil al celulelor și, deci, și procesul locomotor sunt independente de adeziune, aceasta devenind importantă doar ca factor de "agățare" a unui punct de pe suprafața endoteliului vascular, care să-i permită aducerea în apropiere a extremităților celulare opuse punctului respectiv (vezi fig. 37, 38). În acest fel, prin aderarea în diferite etape, asociate cu contracții și modificări la nivelul citoscheletului, se realizează deplasarea celulei și diapedeza ei. În procesele inflamatorii, ca de altfel și în alte procese fiziologice, interacțiunile celulare au un rol extrem de important. De exemplu, trombocitele au diferite tipuri de receptori care permit aderarea, împrăștierea sau agregarea lor la locul leziunii vasculare.

Receptorii de pe celulele endoteliale, leucocite, trombocite etc. controlează interacțiunile celulare responsabile de migrarea celulei la locul infecției. Toate acestea se realizează prin molecule de adeziune din superfamiliiile imunoglobulinelor, integrinelor, selectinelor sau receptorilor Fc. Dar, exprimarea lor funcțională recunoaște o anumită cinetică. Pentru a asigura migrarea leucocitelor spre locul inflamației, moleculele de adeziune din familiile de imunoglobuline și integrine acționează în interdependență cu selectinele. De pildă,  $\beta 2$  integrinele (LFA-1 și Mac-1) realizează aderarea leucocitelor la receptorii celulelor endoteliale, incluzând membri ai superfamiliei imunoglobulinelor cum ar fi ICAM-1 și ICAM-2 (pacienții lipsiți de  $\beta 2$  integrină prezintă sindromul LAD). În momentul în care celulele endoteliale încep să fie activate funcțional, legarea acestor integrine încetează, intervenind superfamilia selectinelor alcătuită din trei grupe de molecule: L-selectine, P-selectine și E-selectine. După clivarea enzimatică a integrinelor, legarea leucocitelor se face prin L-selectine, respectiv prin LAM-1 exprimate pe cca. 70% din granulocitele PMN circulante. L-selectinele mobilizează granulocitele spre locul inflamației, realizând o aderare slabă care permite "rularea" celulelor sub efectul sangvin de-a lungul pereților vasculari. După activarea celulelor endoteliale, LAM-1 sunt clivate enzimatic "lăsând locul" liber E-selectinelor și P-selectinelor. E-selectinele (ELAM-1) se exprimă numai pe



celulele endoteliale stimulate de la locul agresiunii, dar nu și pe cele normale, nestimulate. Ele sunt receptori pentru PMN și macrofage, dar nu și pentru limfocite, putând lega unul sau mai mulți liganzi sialilați, fucosilați etc. Ultimele intervin P-selectinele (PADG-EM sau proteina de membrană de 140 kD denumită p 140) exprimate pe trombocite și megakariocite, pe celulele endoteliale inflamate. Sunt, ca și E-selectinele, receptori pentru granulocitele PMN și macrofage, dar nu pentru limfocite, legându-se la oligozaharidele de pe membrana acestora, oligozaharide care conțin cantități mari de acid sialic.

Pentru a putea media legăturile intercelulare, toate cele trei selectine solicită prezența  $Ca^{2+}$ .

Desigur că aceste "momente" în aderarea intercelulară sunt incomplete, *in vivo* probabil că fenomenele sunt mult mai ample și mai complexe. În orice caz, studiul moleculelor de adeziune ar putea aduce noi informații teoretice și practice de o valoare încă greu de evaluat în momentul de față.

## RECEPTORII DE MEMBRANĂ

Receptorii de membrană sunt complexe moleculare cu ajutorul cărora celula recunoaște specific sau nespecific diferiți "liganzi". În ultimă instanță, relația ligand-receptor este un proces informațional care stă la baza activării sau inhibării unor funcții celulare. Majoritatea receptorilor sunt situați la nivelul membranei, de unde și denumirea lor de "receptori de membrană", recunoscând diferite antigene, lectine, enzime etc. Unii receptori, în special cei pentru hormoni, sunt situați în interiorul celulei, fie la nivelul citoplasmei, fie la nivelul nucleului (tabelul 78). În multe cazuri receptorii sunt și markeri pentru celulele respective. De exemplu, receptorii pentru antigen de pe suprafața limfocitelor B sunt și markeri pentru aceste celule, deoarece sunt singurele celule din organism care au molecule de imunoglobuline "implantate" în membrana plasmatică. În cazul limfocitelor T, receptorul pentru eritrocitele de oaie (receptorul E) este și marker pentru ele. Există o categorie specială de receptori, exprimați pe precursorii celulelor limfoide și pe limfocitele imunocompetente, care orientează aceste celule spre organele limfoide primare, în cazul precursorilor, sau spre ariile T sau B dependente din organele limfoide secundare, în cazul celulelor competente imunologic.

Tabelul 78

Diferite poziții la nivel celular unde se pot localiza receptorii pentru hormoni  
(după A.O. Janne și K. Kontula)

Localizare la nivelul	Receptori pentru hormoni
Membranei plasmactice	Oestrogeni, insulină, histamină, hormoni de creștere, ACTH, prostaglandine, catecolamine, glucagon, neurotransmițători
Citoplasmei	Steroizi, vitamina D
Nucleului	Hormoni tiroidieni, steroizi



Sunt "receptorii pentru acasă" sau "homing" și sunt foarte puțin cunoscuți, atât din punct de vedere al structurii biochimice cât și funcțional. În orice caz, ei ajută celula să găsească drumul spre locul unde se va matura sau unde-și va desfășura activitatea. Fixarea ligandului la suprafața celulei, fie prin aderare neimună, fie prin recunoașterea specifică de către receptor, este un act biologic comun tuturor celulelor sistemului limfoid, dar soarta ligandului depinde de tipul de celulă care l-a fixat. În cazul macrofagelor, de exemplu, ligandul este fagocitat, internalizarea fiind mai rapidă atunci când el a fost fixat la nivelul receptorilor Fc prin intermediul anticorpilor și mai lentă atunci când a fost atașat la membrana plasmatică prin molecule de adeziune. În cazul celulelor dendritice din splină sau ganglioni limfatici, ligandul este menținut la suprafața celulei într-o formă accesibilă limfocitelor, fără a mai fi internalizat.

În linii generale, recunoașterea ligandului de către receptor poate avea consecințe diferite, dintre care cele mai importante ar fi următoarele:

- a) menținerea un oarecare timp a ligandului atașat la suprafața celulei;
- b) legarea încrucișată a receptorilor, în special a celor de natură imunoglobulinică de pe suprafața limfocitelor B, urmată de transmiterea de semnale activatoare în interiorul celulei;
- c) mobilizarea complexelor ligand-receptor și aglomerarea lor sub formă de "pete" dispersate uniform pe suprafața celulei, sau sub formă de "glugă", de aspectul unei "căciuli" la un pol al celulei;
- d) desprinderea celor care nu sunt internalizați prin "raderea" lor și pătrunderea în circulație sub formă de molecule libere sau de complexe antigen-anticorp;
- e) endocitoza complexelor, urmată de degradarea și "prelucrarea" intracelulară a lor (aceste procese au loc la nivelul macrofagelor);
- f) exocitoza materialului prelucrat (în special în cazul celulelor "prezentatoare de antigen").

Raderea și eliminarea receptorilor este un proces care interesează numai moleculele de la suprafață, de la nivelul membranei plasmatice, ca de pildă antigene de histocompatibilitate, moleculele de imunoglobulină cu funcție de receptori pentru antigen de pe limfocitele B, diferite fosfolipide, glicoproteine etc. Procesul este continuu, selectiv, nu afectează viabilitatea celulelor, contribuind la modularea permanentă a membranei ei.

Desprinderea, evidențiată prin tehnici de iodurare a proteinelor folosind drept catalizator peroxidaza, se realizează probabil proteolitic și interesează în special domeniile de tip II ale membranei celulare ale căror componente se dovedesc a fi unități funcționale cu rol în recunoașterea structurilor străine de celulă. Internalizarea componentelor non-proprie este atributul major al celulelor cu funcții fagocitare, deși acest proces biologic poate fi întâlnit și la celulele nefagocitare, în care pot pătrunde prin difuziune enzime sau hormoni, care vor fi recunoscuți și fixați de către receptorii de la nivelul citoplasmei sau membranei.

Schematic, internalizarea sau endocitoza se realizează în următoarele secvențe:

- a) recunoașterea ligandului și fixarea lui la receptor;
- b) mobilizarea complexelor ligand-receptor;
- c) internalizarea lor (endozomi, fagozomi);
- d) desfacerea în interiorul fagozomilor a complexelor și denaturarea ligandului, cu sau fără păstrarea determinantilor antigenici.



Precursorii celulari care descind din celula matcă migrează spre timus sau rămân cantonați în măduva osoasă, unde sunt "școlarizați" pentru a deveni celule efectoare *T*, respectiv *B*. Odată maturate, limfocitele pătrund în circulația periferică și în organele limfoide secundare, unde cantonează în "arii" bine delimitate, specifice celulelor *T* sau *B*. Această migrare diferențiată este posibilă datorită existenței, la nivelul membranei precursorilor sau celulelor competente imunologic, a unor receptori care recunosc liganzii de la nivelul ariilor respective deci care-și recunosc "domiciliul", de unde și denumirea lor de receptori pentru "homing". În fond, sunt molecule de suprafață cu funcție de receptori care recunosc determinanți specifici de pe membrana celulelor endoteliale care căptușesc venulele organelor respective (ganglioni, splină, timus etc.), orientând selectiv subpopulațiile celulare spre ariile lor specifice, de unde concluzia că interacția limfocit-endoteliul venulelor este organ-specifică.

De dată foarte recentă, au putut fi identificați unii dintre acești receptori, deși în acest domeniu încă există foarte multe necunoscute și incertitudini. Astfel, la nivelul limfocitelor competente din circulația sangvină, ar exista o proteină receptor (la șoarece este recunoscută de către anticorpii monoclonali Mel-14) care ar recunoaște reziduul "fosfomanosil" după unii, sau "glucozaminoglicanol" de la nivelul plăcilor Peyer, ganglionilor, endoteliilor etc. Această proteină cu funcție de receptor pentru homing este antigenul CDw44 de pe suprafața limfocitelor și celulelor neuronale cu greutate moleculară 85-95 kD și cu o secvență a ultimelor 90 de reziduuri dinspre extremitatea NH<sub>2</sub> terminală omoloagă cu secvența proteoglicanilor din domeniile globulare ale cartilajelor (fig. 108). CDw44 pare analog altor proteoglicani transmembranari care pot lega structuri extracelulare la citoschelet. Acest receptor, prezent atât pe limfocite cât și pe alte tipuri de celule care exprimă CDw44, ar recunoaște, dependent de Ca<sup>2+</sup> polizaharizii bogăți în glucozofosfat sau manozo-6-fosfat de la nivelul venulelor endoteliale din ariile limfoide ale ganglionilor limfatici periferici, deși nu este exclus ca ligandul pentru acest receptor să fie și un hidrat de carbon anionic, cu atât mai mult cu cât proteinele receptorului pentru "homing" par a fi înzestrate cu situsurile de legare pentru hidrații de carbon. În orice caz, există speranța că în viitorul apropiat cunoștințele referitoare la natura acestor receptori vor fi mult mai exacte, deși problema în sine nu este atât de ușor de rezolvat, deoarece receptorii pentru "homing" la hemocitoblaști în special, care se pare că sunt primii exprimați la nivelul membranei, ar putea avea o existență efemeră, supusă modulării antigenice ireversibile.

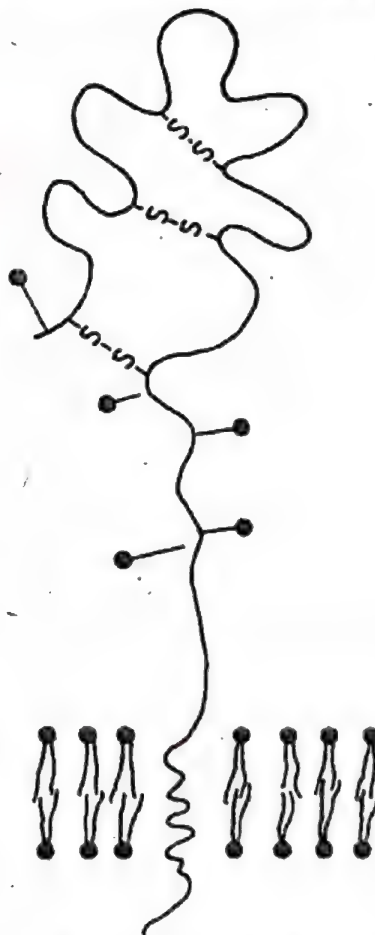


Fig.108. Receptorul pentru "ecotaxie" este un lanț polipeptidic cu trei duble legături disulfidice intralanț și cu diferite locuri de fixare a oligozaharidelor (după D.R. Coombe și col.)



Natura imunoglobulinică a acestor receptori este bine precizată. Astfel, dacă un epitop este legat la particule solide introduse într-o coloană de sticlă și dacă prin această coloană se trece o populație de limfocite, limfocitele B care au receptori pentru epitopul fixat vor fi reținute pe coloană (cromatografie de afinitate). Receptorii de pe membrana celulelor au legat antigenul care, fiind la rândul lui fixat la particule, a reținut celulele. Dacă însă, înainte de trecerea celulelor prin coloană, sunt trecute molecule de imunoglobulină cu funcție de anticorpi anti-epitopul respectiv, celulele nu vor mai fi reținute, deoarece anticorpul liber a blocat epitopii. Același efect se obține și prin tratarea limfocitelor cu ser anti-imunoglobulină; anticorpul anti-imunoglobulină se fixează pe receptorii de natură imunoglobulinică ai limfocitelor B blocând funcțiile lor. Prin astfel de metode se poate verifica nu numai existența receptorilor de natură imunoglobulinică de pe suprafața limfocitelor, dar și validitatea teoriei "selecției clonale", respectiv existența clonelor de celule cu receptor unic pentru antigen. De exemplu, printr-o coloană, în care se găsește fixat la particule solide un anumit determinant antigenic, se trece o populație de limfocite, după care celulele eluate (nereținute pe coloană) sunt inoculate la șoareci iradiați letal. Animalele astfel reconstituite pot răspunde prin sinteză de anticorpi atunci când sunt stimulate antigenic față de toți determinanții antigenici existenți în natură, cu excepția celui care a fost fixat pe coloana cromatografică, deoarece acesta a reținut clona de celule B cu receptori pentru el. Cu alte cuvinte, animalele iradiat letal și reconstituite au primit toate clonele de limfocite, cu excepția clonei reținute pe coloană.

Un limfocit B are pe suprafața sa cca.  $10^5$  receptori cu specificitate pentru un singur epitop, pe care celula este predestinată să-l recunoască. Acești receptori sunt încorporați în membrana celulară, având expus la suprafață fragmentul Fab al moleculei (de la capătul  $\text{NH}_2$  terminal al lanțurilor grele și domeniile  $\text{CH}_3$  sau  $\text{CH}_4$ ). Sunt dispuși uniform pe suprafața celulelor murine și sub formă de "pete" pe limfocitele umane și suferă mișcări de redistribuire (capping), independent de mișcările de redistribuire ale altor structuri existente pe suprafața membranei celulare (fig. 109). Receptorii pentru antigen de pe majoritatea limfocitelor B aparțin claselor IgM și IgD, o proporție mică de celule (cca. 2-5%) având și receptori aparținând altor clase de imunoglobuline. Într-un stadiu de dezvoltare precoce, precursorii limfocitelor B sunt lipsiți de receptori de membrană. Pe măsura maturării lor, apar întâi intracitoplasmatic lanțurile  $\mu$ , apoi receptorii IgM, antigenele DR (sau la la șoarece) ale MHC și, în sfârșit, receptorii IgD (fig. 110).

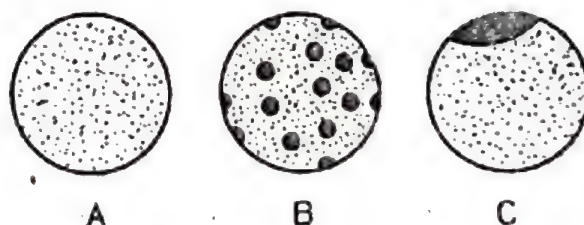


Fig.109. Receptorii de pe suprafața limfocitelor pot fi dispersați uniform pe membrana plasmatică (A) sau sub formă de "pete" (B). Când fixează ligandul, se adună la un pol al membranei sub formă de "glugă" (C), după care sunt internalizați.



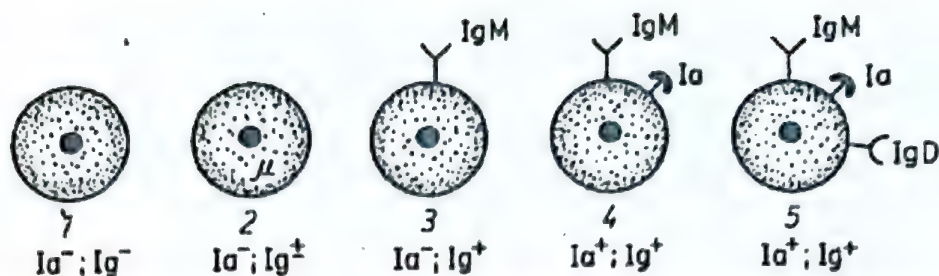


Fig.110. Exprimarea antigenelor complexului major de histocompatibilitate (Ia) și a receptorilor de natură imunoglobulinică pe membrana limfocitelor B de șoarece. În stadiile timpurii de dezvoltare (1) celulele nu exprimă antigene Ia și receptori, fiind  $Ia^-$ ,  $IgM^-$  și  $IgD^-$ . Ulterior, în diferite stadii de maturare, apar intracitoplasmatic lanțurile  $\mu$  (2), receptorii IgM (3), antigenele Ia (4) și apoi receptorii IgD (5), celula devenind imunocompetentă ( $Ia^+$ ,  $IgM^+$ ,  $IgD^+$ ).

Nu se cunoaște precis de ce pe aceeași celulă coexistă receptori IgM și IgD. S-a susținut că celulele IgD ar răspunde normal la stimuli cu antigene timo-dependente, dar nu și la stimuli cu antigene timo-independente. Rezultatele experimentale sunt însă contradictorii. Se pare că și limfocitele  $IgD^-$  pot reacționa la antigene timoindpendente, dar necesită unele semnale de la limfocitele  $T$  pe care celulele  $IgD^+$  nu le solicită.

În momentul în care antigenul a fost recunoscut și fixat de către receptori imunoglobulinici, la nivel celular se declanșează o serie de evenimente care se succed în următoarea ordine: legarea încrucișată a receptorilor imunoglobulinici pe suprafața celulei, modificări în arhitectura citoscheletului, producerea sau activarea unor mesageri intracelulari și, în sfârșit, exprimarea de noi receptori pe membrană. Dar natura receptorilor de membrană ar putea influența unele funcții ale celulei și lăsa indiferente altele. Din acest punct de vedere, este posibil ca legarea antigenului la receptorul IgD să declanșeze activarea celulei, iar legarea la receptorii IgM să conducă spre declanșarea unor mecanisme de control și autoreglare. Receptorii IgM se găsesc numai sub formă de monomeri, nu și de pentameri. Legarea antigenului la acești receptori ar declanșa atât funcțiile ei secretoare cât și unele procese de control, de genul toleranței. Dar și această posibilitate este speculativă, deoarece existența unor populații celulare cu caracter leucemic (cum ar fi linia de celule Daudi cu receptori IgM pentru antigen, rezultată din proliferarea neoplazică a limfocitelor  $B$  aflate în acest stadiu de diferențiere) sugerează că receptorii IgM, chiar dacă au vreun rol, nu pot controla eficient funcțiile proliferative ale celulei.

În afară de receptori pentru antigen din clasa IgM și IgD, sunt și limfocite cu receptori imunoglobulinici din clasa IgG, IgA sau IgE. De la un bolnav cu boala Hodgkin a fost obținută și se menține *in vitro*, ca linie stabilizată, linia limfoidă S59 în care celulele au receptori de membrană din clasa IgG. La persoanele cu infecții parazitare, populația celulară cu receptori IgE este mai bogată, iar exprimarea acestora pe membrana celulei mai puternică.

#### RECEPTORII PENTRU ANTIGEN PE MEMBRANA PLASMATICĂ A LIMFOCITELOR $T$

Deoarece pe membrana celulelor  $T$  se găsesc atașate molecule de imunoglobulină, a fost acreditată ideea că și la această clasă de limfocite receptori pentru antigen sunt tot de natură imunoglobulinică. Dar, unele fapte experimentale contraveneau flagrant acestui concept. Astfel, limfocitele  $T$  nu pot fi



reținute prin cromatografie de afinitate așa cum sunt reținute celulele *B*. Mai mult, anticorpii anti-imunoglobulinici nu blochează funcțional receptorii pentru antigen de pe *T*, fapt care infirmă natura imunoglobulinică a lor. Studii ulterioare au demonstrat fără echivoc că imunoglobulinele de la nivelul membranei limfocitelor *T* sunt atașate citofil și nu implantate în dublul strat lipidic al membranei. Dar, dacă limfocitele *T* sunt tratate cu anticorpi anti-idiotip, adică anti- $V_H$  și  $V_L$ , aceștia se leagă de receptori în maniera de reacție antigen-anticorp, de unde concluzia că receptorul pentru antigen al celulei *T* are un situs combinativ cu o structură idiotipică identică regiunii variabile a receptorului pentru antigen de pe limfocitul *B*. Deci, receptorul pentru un anumit determinant antigenic are aceeași specificitate de recunoaștere atât pe limfocitele *T* cât și pe cele *B*. Într-adevăr, între receptorii pentru antigene ale celor două clase de limfocite există multe asemănări. Și unii și alții sunt monomeri alcătuiți din două lanțuri ( $H$  și  $L$  în cazul limfocitelor *B*,  $\alpha$  și  $\beta$  sau  $\gamma$  și  $\delta$  în cazul celor *T*), care la extremitatea  $NH_2$  terminală formează situsuri combinative identice atunci când au specificitate pentru același epitop, indiferent de similitudinea dintre domeniile  $V$  ale receptorilor pentru antigene de pe limfocitele *T* și *B*: au aceeași mărime, formă, complementaritate pentru antigen etc. De asemenea, lanțurile au extremități  $COOH$  terminale cu o secvență constantă a amino-acizilor, la extremitatea căreia se află un segment transmembranar prin care sunt ancorate la membrană. Dar, pe lângă aceste asemănări există și multe deosebiri, regulile de recunoaștere a antigenelor de către limfocitele *T* și *B* fiind total diferite. Astfel, receptorul pentru antigen de pe limfocitele *T* are, ca și cel de pe limfocitele *B*, determinanți idiotipici asociați regiunii variabile a lanțurilor, dar nu are determinanți izotipici de genul celor prezenți la nivelul fragmentului  $F_c$  al lanțurilor grele ( $H$ ). Segmentul transmembranar  $COOH$  terminal, în cazul receptorului pentru antigen de pe limfocitul *T*, este prea scurt implantat în citoplasmă, în care pătrunde doar o porțiune mică din el, din care cauză nu poate transmite semnale în interiorul celulei. De aceea, pentru a deveni un situs activ, se asociază altor proteine la nivelul membranei sau citoplasmei care transmite sau vor contribui la transmiterea semnalelor.

Patru direcții de abordare au permis elucidarea enigmelor referitoare la receptorii pentru antigen de la nivelul limfocitelor *T*, și anume: a) obținerea de clone de celule *T* cu receptori pentru diverși epitopi care au putut fi cultivate și menținute *in vitro*; b) utilizarea anticorpilor monoclonali anti-diverse componente moleculare care intră în alcătuirea receptorului; c) clonarea genelor care controlează sinteza diferitelor regiuni ale lanțurilor polipeptidice care formează receptorul și d) izolarea receptorului și studierea sa din punct de vedere chimic.

Cu ajutorul acestor metodologii, s-a demonstrat că receptorul pentru antigen de pe membrana limfocitului *T* este format din heterodimeri reprezentați de lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$  sau  $\gamma$  și  $\delta$ , cu regiuni constante și regiuni variabile, asemănătoare regiunilor variabile ale imunoglobulinelor. Prin disocieri parțiale cu detergenți (Triton X100, digitonină etc.), prin studiul variantelor apărute spontan la celulele *T* care conțin un singur lanț  $\alpha$  sau  $\beta$  și nu dimerul  $\alpha\beta$ , precum și prin transplantarea de grupe de lanțuri la celulele non-*T*, deci la alte celule decât limfocitele *T*, și asamblarea lor în maniere diferite, au fost obținute diverse complexe moleculare și au fost identificate toate lanțurile polipeptidice care intră în componența receptorului pentru antigen de pe celule *T*.

Acum se știe precis că acest receptor este format din:

- a) două lanțuri polipeptidice denumite heterodimeri  $\alpha\beta$  sau  $\gamma\delta$  care recunosc specific determinantul antigenic și care funcțional sunt similari receptorilor de natură imunoglobulinică ai celulelor *B*, denumiți prescurtat TCR (T cell receptors);
- b) moleculele constitutive care formează complexul CD3 cu lanțurile  $\gamma\delta$  la care este asociat lanțul  $\alpha$  și eventual și lanțul  $\beta$ . Acest complex contribuie la transmiterea informației despre antigen în interiorul celulei (fig. 111);



c) monomerul  $\alpha$  (CD4) sau dimerul  $\alpha\beta$  (CD8), niște lanțuri polipeptidice adiționale care recunosc antigenele de clasa II, respectiv de clasa I MHC de pe membrana celulei prezentatoare de antigen (APC);

d) proteine auxiliare (CD2, LFA-1) care realizează legarea limfocitului T la celulele prezentatoare de antigen și menținerea lui în contact cu aceste celule pe toată durata obținerii informațiilor despre antigen.

Complexul TCR-CD3 conține cca. 7 lanțuri polipeptidice din superfamilia imunoglobulinelor (cu extremitatea  $\text{NH}_2$  terminală exprimată la nivelul celulei și cu cea  $\text{COOH}$  terminală implantată în citoplasmă) alcătuite din domenii extracelulare, transmembranare și intracelulare, cu lungimi și greutatea moleculare diferite (tabelele 79 și 80).

Receptorul pentru antigen  $\alpha\beta$  este exprimat pe majoritatea limfocitelor T imuno-competente și alcătuit din heterodimerul  $\alpha\beta$  (TCR), lanțurile  $\gamma\delta\epsilon$  ale grupului CD3 și lanțurile  $\zeta$  sau  $\eta$  (fig.112).

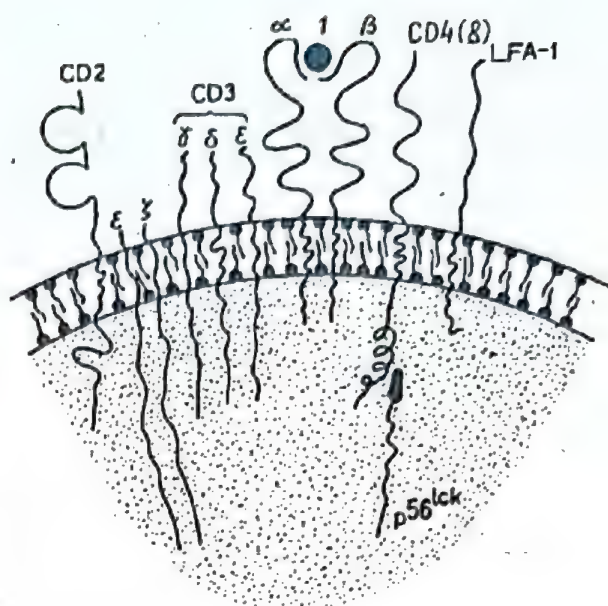


Fig.111. Receptorul pentru antigen al limfocitului T are o structură complexă. Este alcătuit din heterodimerul  $\alpha\beta$  care recunoaște specific antigenul (1), din complexul CD3 cu lanțurile  $\gamma\delta\epsilon$ , din monomerul  $\zeta\zeta$  sau heterodimerul  $\zeta\eta$ , precum și din moleculele asociate sau accesorii (CD2, CD4, CD8, LFA-1) care asigură fuziunea cu celulele prezentatoare de antigen (APC).

Tabelul 79

Grupe de molecule care intră în componența receptorului pentru antigen sau au rol în transmiterea unor semnale către limfocitul T

Grupa de molecule	Lanțurile polipeptidice care le compun	Funcții principale
Moleculele care recunosc specific antigenul (TCR)	Heterodimerii $\alpha\beta$ sau $\gamma\delta$	Recunosc specific epitopii, sub restricție MHC
Molecule de recunoaștere a MHC	Lanțurile $\alpha$ (CD4) Lanțurile $\alpha$ și $\beta$ (CD8)	Recunosc antigenele MHC de la nivelul celulelor APC
Molecule de transmitere de semnale	$\gamma\delta\epsilon$ (CD3) și $\zeta\eta$	Implicate în transmiterea către nucleu a semnalelor de recunoaștere primite de la TCR
Molecule de adeziune	CD2	Leagă LFA-3 de celulele APC
	LFA-1	Leagă ICAM-1 sau ICAM-2 de pe celulele țintă
Alte molecule cu rol în transmiterea de semnale	Receptori pentru interleukine	Fixează IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 etc.
	CD 28 și CTLA-4	Leagă B7 de pe APC
	CD 5	Leagă CD 72 de pe APC



Tabelul 80

**Caractere structurale ale lanțurilor din complexul TCB - CD8  
(după A. Ezquerra și J.E. Coligan)**

Complexul (lanțului)		Greutatea moleculară (kD)		Glicozilarea		Legături disulfidice
		Om	Șoarece	Om	Șoarece	
Hetero- dimerul	$\alpha$	45 - 60	45 - 55	+	+	Heterodimer
	$\beta$	40 - 45	40 - 55	+	+	Heterodimer
	$\gamma$	40 - 55	35 - 42	+	+ / +	Heterodimer
	$\delta$	40 - 60	44 - 62	+	+	Heterodimer
CD3	$\gamma$	25 - 28	21	+	+	-
	$\delta$	20	28	+	+	-
	$\epsilon$	20	25	-	?	-
Lanțuri	$\zeta$	16	16	-	-	x
accesorii	$\eta$	?	?	?	?	x

Notă. Deși sunt notate la fel, totuși lanțurile  $\gamma\delta$  ale heterodimerului  $\gamma\delta$  sunt distincte de cele din componența complexului CD3. x = Pot forma heterodimeri  $\zeta\eta$  sau heterodimerul  $\zeta\zeta$ .

Determinantul antigenic este recunoscut de către situsul combinativ situat la extremitatea  $\text{NH}_2$  terminală a lanțurilor  $\alpha$  de 40-50 kD și  $\beta$  de 40-44 kD cu un mare potențial de legare a unor oligozaharide, în special manoză, și codificate de către gene diferite. Ca și moleculele de imunoglobulină, fiecare lanț are un segment extracelular cu o regiune variabilă V ( $V\alpha$  sau  $V\beta$ ) alcătuită din 102-109 reziduuri de aminoacizi, și alta constantă C ( $C\alpha$  sau  $C\beta$ ) alcătuită din 87-113 reziduuri, un segment transmembranar (20-24 reziduuri de aminoacizi) și unul intracitoplasmatic foarte scurt cu 5-12 aminoacizi. Lanțurile sunt legate între ele prin legături disulfidice (-S-S-), care fac legături și în cadrul aceluiași lanț, deci legături inter- și intralanț. Segmentul intracitoplasmatic, o adevărată "coadă" hidrofilică scurtă, se leagă necovalent la proteinele grupului CD3 auxiliar care preia informația despre antigen și o transmite citoplasmei. Datorită unor reziduuri Cys de la nivelul segmentelor extracelulare, dubbele legături disulfidice intralanț formează câte o buclă la nivelul regiunii V și la nivelul regiunii C. Se pare că regiunile  $V\alpha$  și  $V\beta$  pot recunoaște antigenul fie independent, fie asociate, situație în care o regiune  $V\alpha$  a unui lanț  $\alpha$  care recunoaște specific un epitop

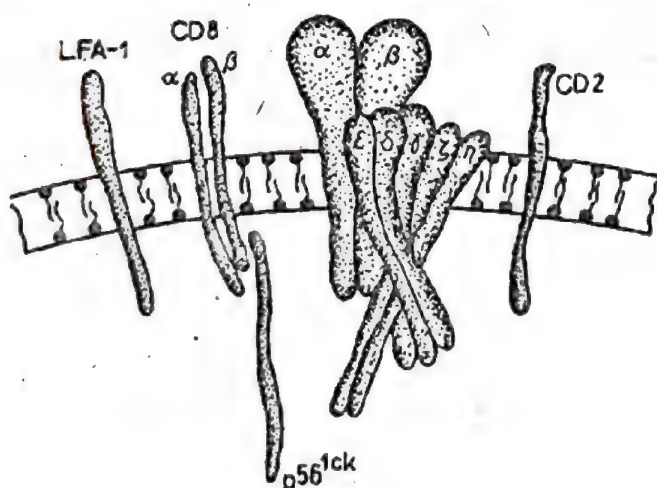


Fig.112. Reprezentarea stilizată a receptorului pentru antigen al limfocitului T. Heterodimerul  $\alpha\beta$  este asociat cu lanțurile  $\gamma\delta\epsilon$  ale CD3 și cu dimerul  $\zeta\zeta$  sau  $\zeta\eta$ . Moleculele accesorii LFA-1 și CD4 sau CD8 leagă antigenele MHC, ICAM etc.

intralanț. Segmentul intracitoplasmatic, o adevărată "coadă" hidrofilică scurtă, se leagă necovalent la proteinele grupului CD3 auxiliar care preia informația despre antigen și o transmite citoplasmei. Datorită unor reziduuri Cys de la nivelul segmentelor extracelulare, dubbele legături disulfidice intralanț formează câte o buclă la nivelul regiunii V și la nivelul regiunii C. Se pare că regiunile  $V\alpha$  și  $V\beta$  pot recunoaște antigenul fie independent, fie asociate, situație în care o regiune  $V\alpha$  a unui lanț  $\alpha$  care recunoaște specific un epitop

unic se poate asocia cu diferite lanțuri  $V\beta$  cu alte specificități, și invers. În acest fel, se amplifică potențialul de recunoaștere a receptorului pentru antigen (fig. 113).

Lanțurile polipeptidice ale grupului CD3 au o secvență a aminoacizilor omoloagă, în special cele  $\gamma$  și  $\delta$ , și legături disulfidice intralanț, care la lanțul  $\epsilon$  sunt mai numeroase.

Secvența reziduurilor de aminoacizi la nivelul domeniului intracitoplasmatic este identică la toate cele trei lanțuri, probabil și datorită faptului că genele care le controlează sinteza sunt situate pe același cromozom (cromozomul 11).

Unii susțin că lanțul  $\beta$  din dimerul  $\alpha\beta$  ar fi legat covalent la lanțul  $\gamma$ , iar lanțul  $\alpha$  la lanțul  $\delta$  din grupul CD3.

La celulele  $T$  cu deficit de lanț  $\delta$  este un exces de lanțuri  $\gamma$  care se pare că le înlocuiesc pe cele  $\delta$  care lipsesc.

Lanțul  $\zeta$  cu cca. 143 reziduuri de aminoacizi este implantat adânc în citoplasmă. Are un segment extracelular foarte scurt, cu 9 reziduuri de aminoacizi, dintre care unul este Cys, un segment transmembranar de 20-21 de reziduuri de aminoacizi și unul citoplasmatic cu 113 reziduuri. Majoritatea lanțurilor formează homodimeri  $\zeta\zeta$ , dar cca. 10 dintre ele pot forma și heterodimeri în care asociază lanțul  $\eta$  ( $\zeta\eta$ ), un lanț diferit de toate celelalte care intră în componența CD3 sau asociate acestuia. Heterodimerii se realizează prin legături disulfidice interlanț. Pentru recunoașterea determinantului antigenic și transmiterea intracelulară a semnalelor, nu este suficientă numai participarea complexului TCR-CD3 cu cele 6 sau 7 lanțuri ale sale. Celulele prezentatoare de antigen (APC) îl prezintă pe acesta limfocitelor  $T$  numai în asociere cu moleculele de clasa I sau II a MHC; epitopul este recunoscut de către dimerul  $\alpha\beta$  prin situsul combinativ de la extremitățile  $NH_2$  terminale, iar moleculele MHC de către monomerul CD4 sau dimerul CD8, membri ai superfamiliei de imunoglobuline care vor lega antigenele MHC de clasa II, respectiv de clasa I. Astfel, în procesul de prezentare și recunoaștere a antigenului de către limfocitul  $T$  se formează un complex cuaternar alcătuit din antigen + molecule MHC (clasa I sau II), dimer  $\alpha\beta$  + lanțurile CD4 sau CD8 (vezi fig. 107 și fig. 111).

Polipeptidul unic CD4 este un lanț format din 433 reziduuri de aminoacizi, dintre care 379 formează domeniul extracelular, iar 37 pe cel intracitoplasmatic. În domeniul extracelular sunt 6 reziduuri Cys care realizează legături disulfidice

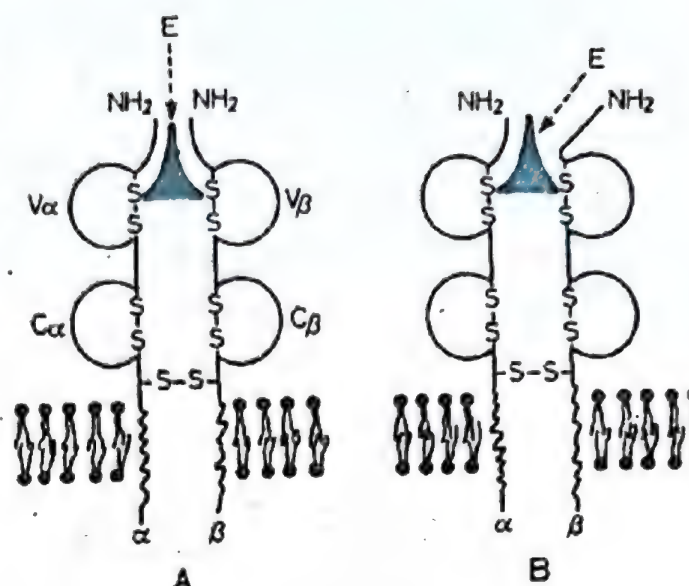


Fig.113. Model ipotetic de realizare a recunoașterii epitopului de către lanțurile  $\alpha\beta$  din componența receptorului pentru antigen.

A. Lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$  au la nivelul extremității lor  $NH_2$  terminale o conformație complementară epitopului E, ambele concurând la formarea situsului combinativ, într-o manieră înalt specifică.

B. Lanțul  $\alpha$  are structura complementară epitopului E iar lanțul  $\beta$  este mai puțin specific. În această situație, recunoașterea este realizată predominant de  $\alpha$ , participarea lanțului  $\beta$  fiind moderată. În schimb, lanțul  $\beta$  poate recunoaște specific epitopii înrudiți, mărindu-se astfel spectrul funcțional al TCR.



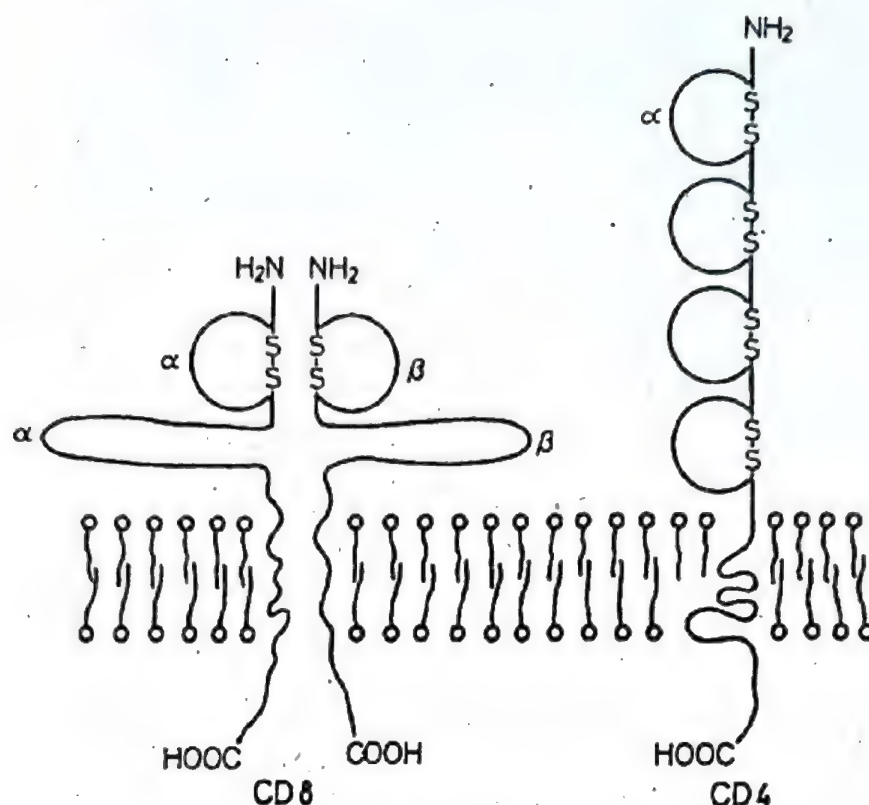


Fig.114. Heterodimerul CD8 ( $\alpha\beta$ ) și monomerul Cd4 ( $\alpha$ ). Detalii în text.

intralanț care vor contribui la formarea a trei bucle. Acest lanț leagă glicoproteina 120 a virusului HIV.

Spre deosebire de monomerul CD4 care este exprimat pe limfocitele *T* ajutătoare și recunoaște moleculele de clasa II a MHC, CD8 este un dimer format din lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$  (sau I și II), fiind exprimat pe celulele *T* citotoxice sau *T* supresoare. Acest dimer recunoaște moleculele din clasa I a MHC. Lanțurile CD8 sunt aproape de două ori mai scurte decât cele CD4, având doar 210 reziduuri de aminoacizi, dintre care 162 formează domeniul extracitoplasmatic și numai 23 pe cel intracitoplasmatic. Au câte două reziduuri Cys care realizează legături disulfidice intralanț și formarea câte unei bucle. De la nivelul rezidului 120 spre rezidul 150, atât lanțul  $\alpha$  cât și cel  $\beta$  sunt pliate, fără a avea legături disulfidice, astfel că ele par mai scurte decât sunt în realitate (fig. 114). În urma contactului cu moleculele din clasa I MHC, aceste curburi se îndreaptă, lanțurile alungindu-se. Atât CD4 cât și CD8 au domeniile intracitoplasmatică foarte scurte, formate din 23-37 de reziduuri de aminoacizi. Pentru a declanșa semnalele necesare proliferării și diferențierii celulare, extremitatea COOH terminală a domeniului lor citoplasmatic se leagă printr-o secvență specifică la un segment din apropierea extremității NH<sub>2</sub> terminale a unei protein-tirozin-kinaze (p56<sup>lck</sup>).

Protein-kinazele alcătuiesc o populație moleculară numeroasă, dintre care unele sunt receptori kinazici iar altele nu sunt receptori dar contribuie la transmiterea semnalelor venite de la alți receptori de membrană. Din această a doua grupă, majoritatea aparțin familiei *src* de tirozin-kinaze. Sunt cel puțin 8 membri ai acestei familii, foarte asemănători între ei din punct de vedere structural și, în parte, responsabili de ancorarea proteinelor la membrana plasmatică. Toți conțin glicină, au domeniile SH<sub>1</sub>, SH<sub>2</sub> și SH<sub>3</sub> și au capacitatea de a fi reglați funcțional prin fosforilarea unui reziduu de tirozină de la extremitatea COOH terminală.

Unii membri ai familiei *src* sunt exprimați restrictiv pe anumite celule sau țesuturi. De pildă, *lck* pe limfocitele *T*, *fgr* pe monocite etc., iar alții, ca *src*, *fyn* sau *yes*, pe fibroblaste și alte celule.

Legătura dintre CD4 sau CD8 și  $p56^{lck}$  este mediată de cys, dar deleția cozii citoplasmice a CD3CD8 abrogă abilitatea de legare a  $p56^{lck}$  și activarea celulei de către antigen. Acest fapt dovedește că ambele lanțuri polipeptidice - CD4 sau CD8 și  $p56^{lck}$  - au rol activ în procesul de conexiune.

Proteina  $p56^{lck}$  are 507 reziduuri de aminoacizi, un domeniu  $NH_2$  terminal cu o regiune de legare a CD4 sau CD8, cu două domenii adiacente a SH2 și SH3, un domeniu "kinază" și o regiune terminală scurtă (fig. 115). Ea este un substrat

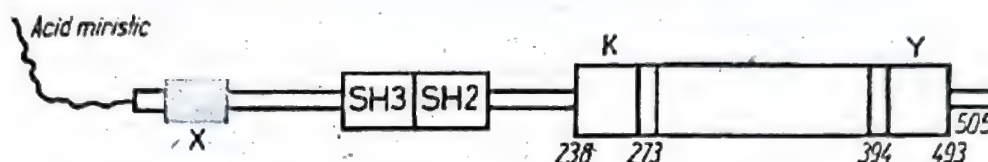


Fig.115. Structura moleculei de proteină  $p56^{lck}$ . Cifrele semnifică poziția aminoacizilor în lanț. x = regiunea de legare a lanțurilor CD4 sau CD8 (după. C. E. Ruod).

pentru CD45, o glicoproteină transmembranară implicată în transducerea semnalelor, a cărei porțiune intracelulară conține reziduuri de serină fosforilată și activitatea de tirozinfosfatază prin care se va activa tirozin-kinaza  $p56^{lck}$ . Prin coaglomerarea CD45 cu CD4 sau CD8, se ajunge la defosforilarea  $p56^{lck}$  și inhibiția activității kinazice a acesteia.

Terminalul glicină este conjugat la grupul "acid miristic" implicat în legarea  $p56^{lck}$ . Regiunea de legare a acestei proteine se fixează la un segment de pe domeniul citoplasmatic al CD4 cu secvența KKTCCPFRFQKT, sau al CD8 cu secvența RRVCKCPRPVKS. Secvențele de legare sunt codificate de către 13 reziduuri de aminoacid localizate la CD4 în mijlocul domeniului citoplasmatic (reziduurile 419-431), iar la lanțul  $\alpha$  al CD8 aproape de suprafața internă a dublului strat lipidic, la nivelul reziduurilor 191-203.

Recunoașterea ligandului, adică a moleculelor MHC de către CD4 sau CD8, activează  $p56^{lck}$  și realizează o posibilă interacție a CD4/CD8 -  $p56^{lck}$  cu alte peptide, rezultând activări enzimatice și fosforilări ale PI (fosfatidil-inozitol), PLC- $\gamma$  (fosfolipaza C- $\gamma$ ) precum și a lanțului  $\alpha$  din cadrul complexului TCR-CD3. Se pare așadar că  $p56^{lck}$  asigură nu numai transmiterea semnalelor activatoare în interiorul celulei, dar și conexiuni funcționale între complexe CD4/CD8 $p56^{lck}$  și TCR-CD3.

Moleculele accesorii nu fac parte integrantă din receptorul pentru antigen al limfocitului *T*, fiind doar asociate acestuia. Cele mai cunoscute sunt CD2, LFA-1 și CD44 care recunosc liganzii LFA-3, ICAM-1 sau ICAM-2 și acidul hialuronic de pe suprafața celulelor antigen prezentatoare. Aceste molecule sunt implicate în aderarea limfocitului *T* la celulele prezentatoare de antigen, contactul asigurat fiind critic pentru facilitarea recunoașterii specifice a antigenului. Totodată, ele sunt candidați potențiali la transmiterea semnalului II care, împreună cu semnalul I transmis de complexul TCR-CD3, activează funcțiile specifice ale celulei *T*.

- Monomerul CD2 este receptorul E prin intermediul căruia limfocitele *T* leagă hematiile de oaie formând "rozete". Acest monomer este o glicoproteină de 50 kD cu un domeniu intracitoplasmatic lung, de 126 de reziduuri de aminoacizi care ar funcționa probabil ca transductor de semnale (fig. 116). Este unul dintre cele mai timpurii antigene de diferențiere intratimică a celulei *T*, care în primele stadii evolutive este CD1<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Monomerul CD2, care recunoaște ligandul natural LFA-3, larg răspândit pe diferite celule, are epitopul T111, responsabil de formarea rozetelor E, deci cu rol de receptor pentru liganzi de pe



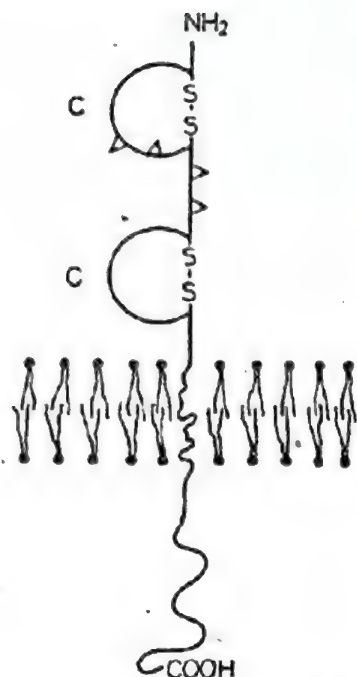


Fig.116. Receptorul E (CD2) este un monomer cu patru reziduuri Cys care formează două bucle constante (C) la nivelul domeniului extracelular. Domeniul intracelular este lung. Triunghiurile negre marchează locurile de inserție a hidraților de carbon.

suprafața eritrocitelor de oaie și epitopii T112 și T113, ultimul fiind probabil exprimat numai pe celulele *T* activate. Se pare că CD2 ar fi implicat în activarea timpurie a limfocitelor *T* tinere, un fel de "cale alternativă" de activare care ar avea loc înaintea exprimării CD3-TCR pe suprafața membranei plasmatică. Într-adevăr, tratarea celulelor *T* cu anticorpi anti-T112 și anti-T113 duce la activarea și proliferarea lor.

Legarea LFA-3 la CD2 declanșează unele evenimente biochimice timpurii care pot preceda celor declanșate de complexul "clasic" TCR-CD3+Antigen+MHC și care în linii mari constau din hidroliza PIP2 (fosfatidil-inozitol-difosfat), translocarea PKC (protein-kinaza C) de la nivelul citosolului spre membrană și creșterea concentrației intracelulare a  $Ca^{2+}$ . Nu este exclus ca molecula responsabilă de inducerea semnalelor CD2 să fie lanțul  $\zeta$ . Lanțul polipeptidic CD2 este exprimat pe toate celulele mature, fiind invariabil legat la complexul molecular TCR-CD3 și intervenind probabil în mecanismele de reglare a acestui complex.

- LFA-1, membră a familiei de integrine  $\beta 2$ , leagă ICAM-1 sau ICAM-2 iar CD44, o moleculă cu funcții puțin cunoscute, leagă acidul hialuronic. Figura 117 redă schematic structura receptorului pentru antigen cu heterodimerul  $\alpha\beta$  și a moleculelor asociate lui.

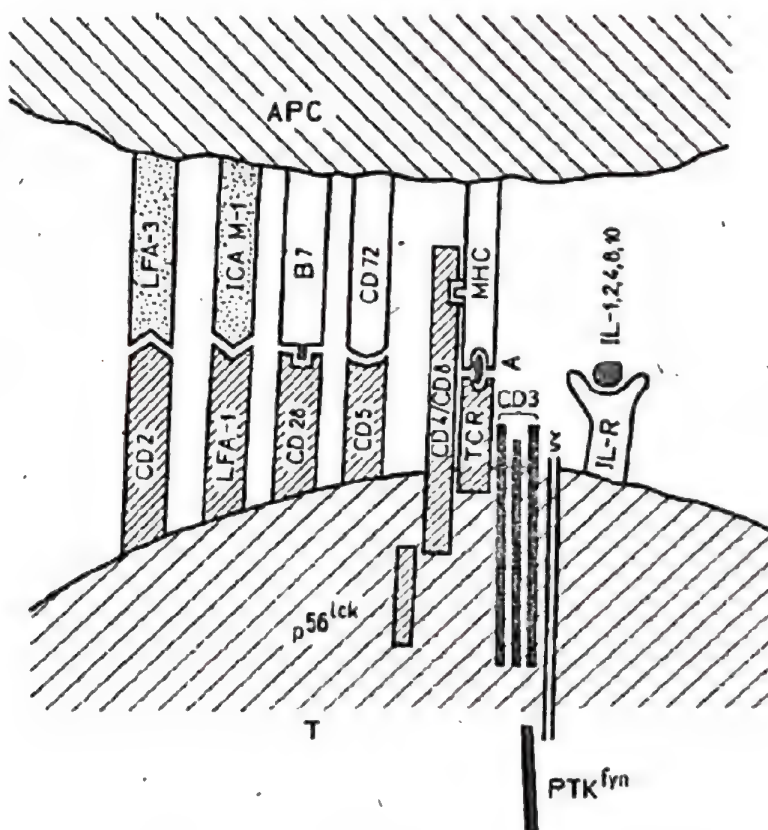


Fig.117. Receptorul pentru antigen pe suprafața limfocitelor *T*.



Receptorul pentru antigen de tip  $\gamma \delta$  (TCR $\gamma\delta$ ) sau receptorul TCR-1, spre deosebire de TCR  $\alpha \beta$  sau TCR-2, este încă insuficient cunoscut. După descoperirea în 1983 a TCR  $\alpha \beta$  în 1985 a fost izolată o genă distinctă care inițial era considerată ca fiind responsabilă de codificarea unei subunități distincte  $\alpha$  a TCR  $\alpha \beta$ . Dar când s-a izolat adevărata genă,  $\alpha$ , s-a constatat că subunitatea considerată a fi  $\alpha$  era de fapt "altceva", o a treia genă, denumită  $\gamma$ . Lanțul  $\gamma$  a fost identificat de precursorii limfocitari din timus în cursul stadiilor foarte timpurii de dezvoltare a limfocitelor  $T$ , considerându-se că nu au decât o importanță tranzitorie în dezvoltarea ontogenică a acestei clase de limfocite. Dar, în 1986, s-a demonstrat că proteina codificată de gena  $\gamma$  se găsește exprimată pe un subset distinct de celule  $T$  și că face parte integrantă dintr-un heterodimer care este un alt TCR decât TCR  $\alpha \beta$ , denumit TCR  $\gamma \delta$ .

Acest receptor apare primul în cursul evoluției filogenetice și ontogenetice, fiind o moleculă conservată evoluționar, care ar media supravegherea imunologică a epiteliilor, contribuind la menținerea integrității straturilor care separă organismul de mediul extern. Nu recirculă în epiteliu și se pare că nu difuzează prin aceste straturi. Timusul uman este colonizat de precursorii  $T$  la 7-8 săptămâni de sarcină, când se diferențiază timocitele CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, din care vor deriva limfocitele T $\gamma \delta$ , procesul fiind dependent de IL-4. Celulele mature cu receptorii TCR $\gamma \delta$  sunt CD2<sup>+</sup> și CD3<sup>+</sup>, dar majoritatea lor sunt CD4<sup>+</sup> și CD8<sup>+</sup>. Ele apar timpuriu în timus, la naștere fiind o minoritate în acest organ. Majoritatea lor ar fi selectată la nivelul epiteliului intestinal, al pielii etc., și nu la nivelul timusului așa cum este cazul celor TCR $\alpha \beta$ . Aici, în prezența moleculelor MHC de clasa II și probabil și a antigenului, ar fi selectate și stimulate pentru a deveni limfocite  $T$  imunocompetente. Se pare că, în acest proces, moleculele MHC de clasa I nu au nici un rol, acesta revenind celor de clasa II. De exemplu, la șoarecii lipsiți de molecule MHC clasa I prin distrugerea genei care controlează sinteza  $\beta 2$ -microglobulinei, limfocitele  $T$  rămân normale din punct de vedere reacțional, fapt care demonstrează că selecția acestora se face în afara epiteliului timic și a moleculelor MHC de clasa I. Ea s-ar face extratimic, la nivelul celulelor epiteliale ale suprafețelor corpului și în prezența moleculelor MHC de clasa II și probabil și a antigenului. Problema este însă discutabilă, deoarece se pare că exprimarea receptorului  $\gamma \delta$  pe suprafața celulelor  $T$  are loc foarte timpuriu în timus, selectarea și activarea celulelor TCR $\gamma \delta$  fiind un proces mai tardiv, care are loc ulterior, după ce celulele au ajuns în periferie. Într-adevăr, limfocitele  $T$  cu receptorii  $\gamma \delta$  reactive la "proteinele de șoc termic" (HSP) sunt prezente în timusul șoarecilor încă de la naștere. La om, ele sunt prezente mult mai timpuriu, la 7-8 săptămâni de viață embrionară, ca populație imatură CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>. La om ar fi două subpopulații de limfocite TCR $\gamma \delta$ : o subpopulație V $\delta$ 1 care exprimă lanțurile V $\delta$ 1 dintre care multe sunt asociate necovalent cu diferite V $\gamma$  C $\gamma$ 2 și care predomină toată viața în timus (ar fi deci forme tinere), și alta V $\delta$ 2 dintre care multe sunt legate prin legături disulfidice cu lanțurile V $\gamma$ 9 C $\gamma$ 1 care predomină în circulația periferică în prima săptămână de viață.

Spre deosebire de limfocitele  $T$  cu receptorii  $\gamma \delta$ , cele cu receptorii  $\alpha \beta$  ar apăra interiorul organismului recirculând prin organele limfoide și recunoscând numai antigenele străine asociate cu moleculele MHC proprii. Această delimitare nu este totuși categorică, deoarece și în organele limfoide există celule cu asemenea receptori. Este foarte adevărat că acestea sunt în proporție mică, de numai 1-2%, totuși există, fapt care demonstrează că ele nu sunt cantonate în exclusivitate la nivelul epiteliilor. Rolul lor este cunoscut, deși se pare că au funcții multiple, ca de pildă funcții citotoxice care ar reprezenta funcția lor majoră, cu și fără restricție



MHC. Pot leza celulele țintă, ca de pildă hematiile de pasăre, celulele infectate bacterian sau tratate cu endotoxine bacteriene, celulele leucemice sau atipice generate *in vivo* etc. De asemenea, au rol protector în unele boli infecțioase cum ar fi rujeola și altele.

Linfocitele  $T$  cu  $TCR\gamma\delta$  sunt mai "modeste" în pretențiile lor față de celulele prezentatoare de antigen în comparație cu cele cu  $TCR\alpha\beta$  cu aceeași specificitate de recunoaștere. Se pare că ele ar recunoaște alți determinanți MHC decât cei recunoscuți de cele  $\alpha\beta$ , ca de pildă un heterodimer particular HLA-DQ și, fapt extrem de important, recunosc proteinele de șoc termic (HSP) autologe și în special secvențele aminoacide ale acestora care au fost cel mai bine conservate în cursul evoluției filogenetice. Această reactivitate la HSP ar fi o funcție de bază a lor, cu rol major în supravegherea imună a epiteliilor.

A fost dovedit faptul că unele limfocite  $T\gamma\delta$  recunosc proteinele bacteriene derivate din mycobacterii, toxoidul tetanic, unii copolimeri sintetici, unele aloantigene etc. Celulele cu acest tip de receptori ar alcătui o "primă linie de apărare", care se formează și se maturează funcțional mult mai rapid decât cele cu  $TCR\alpha\beta$ , conform unei programări genetice de dezvoltare particulară. Este de bănuat că această "accelerare" a maturării lor este strict necesară deoarece pielea, intestinul, pulmonul, sunt primele organe expuse agresiunii bacteriene, așa că, armele de apărare trebuie să fie gata pregătite pentru a neutraliza această agresiune.

Heterodimerul  $\gamma\delta$  este similar din punct de vedere structural celui  $\alpha\beta$ , în sensul că, și la unul și la celălalt, lanțurile polipeptidice au un domeniu extracelular lung, cu un segment variabil  $V$  și unul constant  $C$ , un domeniu transmembranar și unul foarte scurt citoplasmatic. Intralanț, sunt câte două legături disulfidice, una la nivelul segmentului variabil  $V$  și alta la nivelul segmentului constant  $C$ . În cazul  $TCR\gamma\delta$  există însă trei diferențe la nivelul domeniului constant, controlate de gena  $C$  a  $TCR$  care generează trei forme de proteine deosebite structural, exprimate pe diferite clone de celule  $T$  aparținând aceluiași individ. Una dintre ele are legături disulfidice între lanțurile  $\gamma$  și  $\delta$ , iar celelalte două nu au asemenea legături deoarece nu au reziduuri Cys la nivelul extremității constante din proximitatea membranei plastice, dar au alte secvențe aminoacide care le modifică lungimea și forma (fig. 118).

În concluzie, se poate afirma că heterodimerii  $\alpha\beta$  și  $\gamma\delta$ , receptori pentru antigen pe limfocitele  $T$ , din punct de vedere structural sunt similari structurii moleculelor de imunoglobulină. Totuși, se deosebesc de acestea în sensul că sunt formați din câte un singur lanț de un anumit tip asociat altuia de alt tip (un lanț  $\alpha$  asociat altuia  $\beta$ ), pe când moleculele de imunoglobuline sunt dimeri, cu câte două lanțuri  $L$  și două  $H$ , sau chiar multimeri, astfel că molecula receptorului pentru antigen pe limfocitul  $T$  are un singur situs combinativ, în timp ce molecula de imunoglobulină are două sau mai multe situsuri combinate.

Lanțurile  $\alpha\beta$  sau  $\gamma\delta$  sunt asociate cu proteinele complexului CD3 și cu alte molecule de adeziune care, în cazul receptorilor pentru antigen de natură imunoglobulinică de pe limfocitele  $B$ , lipsesc.

Receptorul  $\gamma\delta$  poate exista fie ca un heterodimer legat prin legături disulfidice, deci ca moleculă de tip 1, fie ca o structură legată necovalent, deci ca moleculă de tip 2 sau 3, în funcție de exprimarea celor două gene ale regiunii constante a lanțului  $\gamma$ .

Acest receptor este primul sistem de recunoaștere specifică care a rămas încă într-un stadiu inițial de dezvoltare. Astfel, are o variabilitate restrânsă de recunoaștere, nu poate face discriminări perfecte între epitopii cu structuri apropiate etc. De asemenea,  $TCR\gamma\delta$  sunt exprimați pe timocitele tinere și recunosc

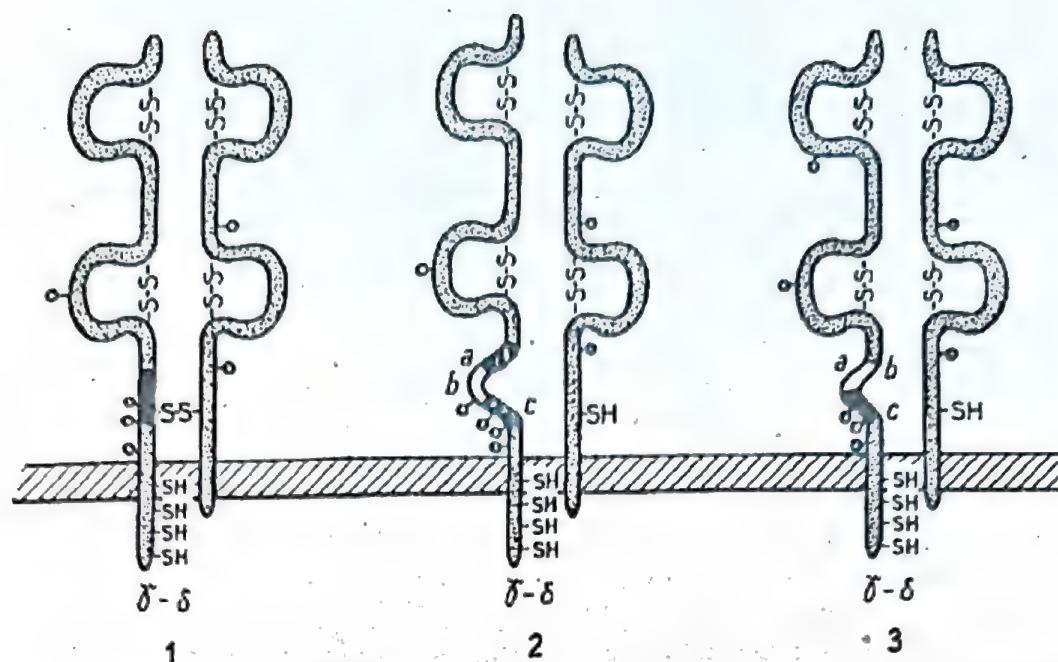


Fig.118. Reprezentarea schematică a celor trei forme diferite de organizare a receptorului  $\gamma\delta$ . Unele lanțuri au reziduuri Cys la nivelul cărora realizează legături disulfidice (forma 1) iar altele nu au astfel de legături inter-lanț (formele 2 și 3) (după S. Porcelli și col.).

proteinele de șoc termic, înalt conservate în cursul evoluției, exprimate atât pe bacterii cât și pe celule eukariote expuse unor condiții de stres. În comparație cu limfocitele cu  $TCR\gamma\delta$ , cele cu  $TCR\alpha\beta$  se pare că au apărut mai recent în cursul evoluției filogenetice.

#### RECEPTORII $Fc$ ( $FcR$ )

Numeroase celule exprimă pe suprafața lor receptori pentru fragmentul cristalizabil ( $F_c$ ) al moleculelor de imunoglobuline aparținând claselor IgG, IgE, IgM, IgA sau IgD, notați cu simbolurile lanțurilor grele ale moleculelor respective:  $Fc\gamma R$ ,  $Fc\epsilon R$ ,  $Fc\mu R$  etc. Este important a nu se confunda termenul de "receptor pentru fragmentul  $F_c$ " cu cel de "fragment  $F_c$ ". Structurile moleculare exprimate pe suprafața celulei prin care aceasta recunoaște și leagă "coada moleculelor de imunoglobulină", adică domeniul  $CH_3$  sau  $CH_4$  (și uneori și ultimele rezidii de la extremitatea COOH terminală a domeniului  $CH_2$ ) al fragmentului cristalizabil  $F_c$ , sunt "receptorii pentru  $F_c$ " sau prescurtat "receptorii  $F_c$ " ( $FcR$ ) iar fragmentul cristalizabil legat este numit simplu fragment  $F_c$ .

$FcR$  se găsesc pe suprafața membranei plasmatică a trombocitelor, granulocitelor neutrofile, eozinofile sau bazofile, pe suprafața mastocitelor, celulelor NK, K, limfocitelor B, pe unele limfocite T etc. Sunt și pe suprafața celulelor epiteliale, endoteliale, spermatozoizilor, celulelor sincițiotrofoblaste și chiar pe suprafața unor paraziți cum ar fi trypanosomele, schistosomii etc. Funcțiile lor sunt multiple, fiind implicate în procesele de citotoxicitate anticorp-dependentă,



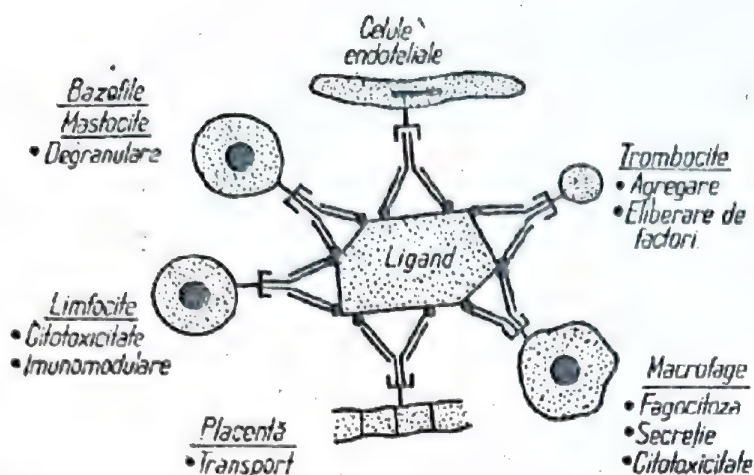


Fig.119. Reprezentarea schematică a principalelor funcții ale receptorului Fc (FcR).

fagocitoză, transport transmembranar, degranulare, eliberare de metaboliți toxici de oxigen etc., (fig. 119).

**Receptorii Fc pentru IgG (FcγR)** sunt exprimați pe diferite celule. Pe baza structurii lor chimice, specificității și afinității pentru antigen, aparțin la trei clase distincte incluse în superfamilia de gene imunoglobulinice, cu o mare omologie în porțiunea extracelulară, dar deosebite la nivelul domeniilor membranare și intracitoplasmatică. Familia receptorilor FcγRI este omogenă, pe când cea a FcγRII și FcγRIII, generate de gene multiple, prezintă diverse forme moleculare (tabelul 81).

Tabelul 81

Unele proprietăți ale receptorilor Fc la om (după J.G.J. van de Winkel și P.J.A. Capel)

Receptorul	CD	Greutatea moleculară	Gena	Afinitatea	Exprimat pe		Leagă IgG
					Constitutiv	Indus	
FcγRI	64	72 kD	FcγRIA FcγRIB FcγRIC	Mare	Monocite Macrofage	PMN Eozinofile	3>1>4>2 Monomer
FcγRII	32	40 kD	FcγRIIA FcγRIIB	Mică	Monocite Macrofage Bazofile Eozinofile Celule B Trombocite Langerhans Celule endoteliale		IIA 3>1>2>4 IIB 3>1>4>2 Polimer

Receptorul	CD	Greutatea moleculară	Gena	Afinitatea	Exprimat pe		Leagă IgG
					Constitutiv	Indus	
FcγRIII	16	50-80 kD	FcγRIIIA	Medie	Monocite Macrofage LGL / NK Celule T	Monocite	1=3>>2,4  Complexe Atg-Atc
			FcγRIIIB	Slabă	Neutrofile	Eozinofile	

*FcγRI* are o mare afinitate de legare a IgG monomer, dar leagă slab și complexele anticorp IgG-antigen. Este unicul receptor care are trei domenii imunoglobulinice în porțiunea extracelulară (fig. 120). Este exprimat aproape în exclusivitate pe suprafața fagocitelor mononucleare, numărul lor variind între 1 000 și 50 000 / celulă. La granulocitele PMN proaspăt izolate este un număr redus de receptori (cca. 1 000 / celulă), număr inductibil cu IFN  $\gamma$  care provoacă o creștere a lui de 5-10 ori. Nu este afectat numeric de alte citokine cum ar fi TNF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3 sau IL-6. Rezistă la tratamentul cu tripsină și pronază și poate fi evidențiat prin tehnica rozetelor EA (eritrocite+anticorpi) folosindu-se hematii cuplate cu IgG monomer uman. Dintre cele trei domenii extracelulare, două sunt omoloage domeniilor extracelulare ale Fc  $\gamma$ R II și Fc  $\gamma$ R II, iar al treilea este distinct și ar fi responsabil de afinitatea mare de legare a lui (fig. 121). Are un singur situs de legare a domeniului CH2 al IgG și poate transmite informația în interiorul celulei fără a mai fi necesară asocierea cu alte subunități.

*FcγRII* ar exista sub trei forme extracelulare identice - Fc  $\gamma$ RIIA, Fc  $\gamma$ RIIB1 și Fc  $\gamma$ RIIB2 - dar cu domenii intracitoplasmice diferite care, ca și în cazul Fc  $\gamma$ RI, nu sunt asociate cu alte subunități. Au afinitate redusă pentru complexele IgG și foarte slabă pentru IgG monomer (mIgG). Receptorul este exprimat practic pe toate celulele hematopoietice care exprimă FcR, cu excepția eritrocitelor și celulelor NK. Are două situsuri de legare, unul pentru domeniul CH2 și altul pentru CH3. Pe suprafața unor celule există cca. 30 000-60 000 de Fc  $\gamma$ RII, numărul lor fiind practic neinfluențat de tratarea acestora cu citokine. Este slab exprimat pe trombocite (cca. 1 000/celulă).

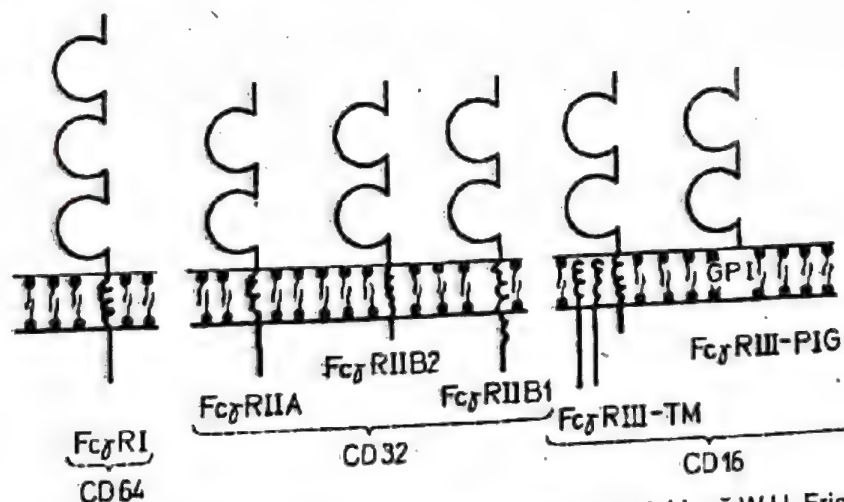


Fig.120. Structura receptorilor pentru Fc: CD64, CD32, CD16 (după W.H. Fridman).



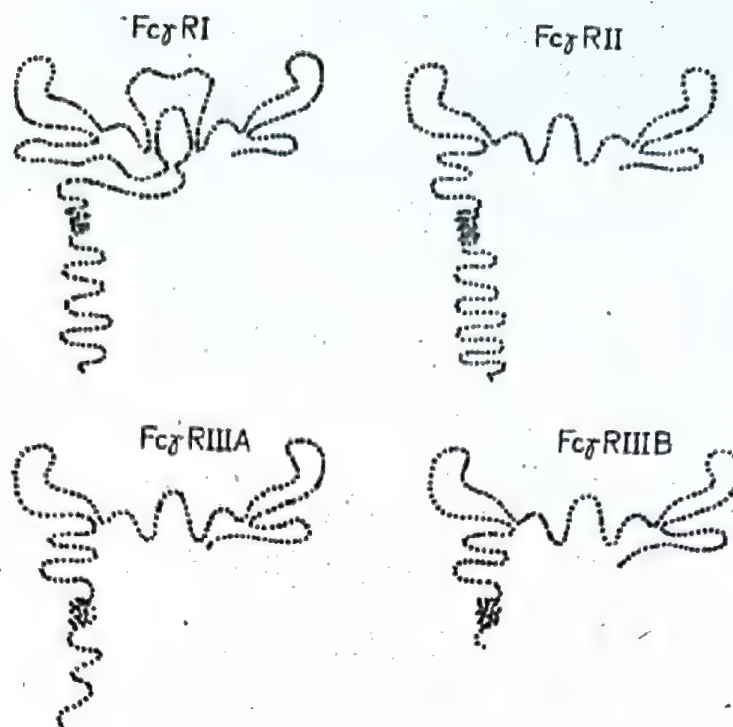


Fig.121. Receptorii Fcγ I, II și III, A sau B pentru IgG (după J.V.Ravetch și J.P. Kinet).

Proteazele cresc afinitatea  $Fc\gamma RII$  pentru IgG, fapt extrem de important *in vivo*, mai ales în inflamații unde sunt prezente diferite enzime. Un indicator pentru acest receptor este testul EA cu eritrocite cuplate cu IgG1 de șoarece, rozetarea fiind puternic activată după tratarea celulelor cu proteaze. Celulele care exprimă  $Fc\gamma RI$  leagă hematiile sensibilizate cu IgG uman cu funcție de anticorpi anti-antigenul D (Rh), pe când cele care exprimă  $Fc\gamma RII$  nu leagă aceste hematii, testul putând face distincția dintre cei doi receptori.

Se pare că  $Fc\gamma RII$  are un rol major în activarea și reglarea activității limfocitelor B. Imediat după stimulul antigenic, celulele B exprimă  $Fc\gamma RII$  cu o capacitate slabă de legare, după care pierde acest receptor, pentru ca într-o fază ulterioară, de fapt între fazele de evoluție G1 și S, să-l exprime foarte intens. Acest receptor nu poate induce activitatea kinazică intracelular, motiv pentru care este necesară legarea încrucișată a receptorului pentru antigen din clasa IgM cu  $Fc\gamma RII$  (fig. 122). După această legare încrucișată, crește autofosforilarea unei tirozin-kinaze (Fyn)

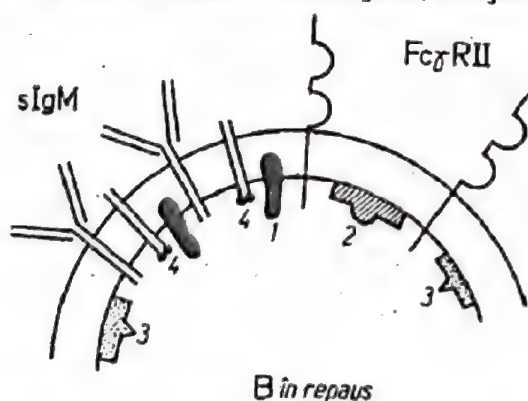


Fig.122. Protein-tirozin-kinaza Fyn (1) și  $Fc\gamma RII$  la celula B în repaus sunt asociate (după G. Sarmay).

la reziduul Tyr, urmată de fosforilarea și activarea altor serin- și treonin-kinaze și, în final, fosforilarea  $Fc\gamma RII$  la nivelul serinei (fig. 123).

Așadar,  $Fc\gamma RII$  exprimat pe limfocitele B joacă un rol important în reglarea sintezei anticorpilor, legarea încrucișată a lor cu receptorii de natură imunoglobulinică pentru antigen (IgM) inhibând sinteza.

$Fc\gamma RIII$  leagă complexe IgG1 și IgG3, fiind din acest

punct de vedere asemănător cu *FcγRII*. Este un polipeptid cu 233 de reziduuri de aminoacizi, cu un domeniu extracelular format din două bucle asemănătoare imunoglobulinelor. Ar exista cel puțin două forme moleculare distincte: una *FcγRIIIA* sau *FcγR-TM*, și alta *FcγRIIIB* sau *FcγRIII-PIG*. Ultima este exprimată pe membrana plasmatică a granulocitelor, PMN în conexiune cu glicozil-fosfatidil-inozitolul. Anticorpilor monoclonali anti-*FcγRIII* (CD16) recunosc în special epitopii exprimați pe *FcγRIII* de pe celulele NK.

*FcγRIII-PIG* se leagă deci la membrana celulară printr-un fosfatidil-inozitol-glican (PIG), deosebindu-se de *FcγRIII-TM* exprimat pe macrofage și celulele NK, unde de altfel este relativ slab reprezentat, fiind doar 1 000-1 500 receptori/celulă în comparație cu 100 000-200 000 /celulă la PMN. Numărul lor nu este influențat de citokine, cu excepția TNF care provoacă o scădere până la 50-60% din nivelul normal, probabil datorită activării fosfolipazelor endogene și în special a fosfolipazei C (PLC) care ar cliva PIG "dezlegând" astfel receptorul de membrană (fig. 124).

Receptorii *Fc* sunt exprimați pe toate celulele hematopoietice, cu excepția hematiilor, precum și pe alte celule, ca de pildă pe celule endoteliale placentare, exercitând o gamă largă de funcții biologice (tabelul 82). Astfel, *FcγRI* contribuie la realizarea fagocitozei opsonice, la citotoxicitatea ADCC, activează prezentarea antigenului de către celulele APC asigurând rezistența organismului față de infecții.

Receptorii *FcγRII* interacționează cu complexele IgG2 și mediază fagocitoza opsonică, iar *FcγRIII* realizează după unii citotoxicitatea ADCC, eliberarea de enzime lizozomale și  $O_2^-$ , fiind foarte activ în fagocitarea hematiilor care au fixat specific anticorpii.

Toate cele trei clase de receptori *Fc* se găsesc și sub formă solubilă în circulație, desprinderea lor realizându-se prin diferite mecanisme. Serul uman conține mari cantități de *FcγRIIIB* eliberați probabil de la nivelul granulocitelor PMN ca urmare a activării unor serin-proteaze. Unii susțin că nivelul ridicat de *FcγRIIIB* în ser ar coincide cu un potențial ridicat de apărare antibacteriană. Problema este discutabilă, deoarece recent s-a constatat că în serul bolnavilor cu infecții

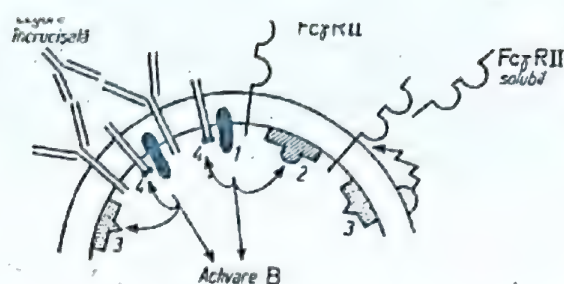


Fig.123. Celula B în curs de activare. Legarea încrucișată a IgM membranare duce la autofosforilarea și activarea diferitelor substraturi, inclusiv kinazele serice (2) și treonina (3). Simultan, serin-proteazele similare tripsinei clivează *FcγRII* în faza de activare a celulei B, blocând astfel semnalele negative care ar putea fi recepționate de *FcγRII* și care ar bloca activarea celulei (după G. Sarmay).

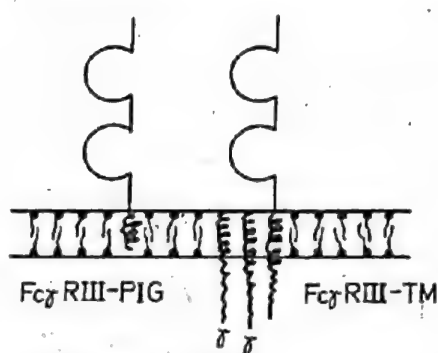


Fig.124. Receptorul *FcγRIII* transmembranar (*FcγRIII-TM*) și cel asociat cu fosfatidil-inozitol-glicanul (*FcγRIII-PIG*) (după W.H. Fridman).



Unele funcții biologice ale receptorilor Fc (după J.G.J. Van de Winkel și P.J.A. Capel)

Funcția	FcγRI	FcγRII	FcγRIII	
			FcγRIIIA	FcγRIIIB
Fagocitoza	+	+	+	-/+
Generarea de O <sub>2</sub>	+	+	+	-/+
Citotoxicitatea ADCC față de:				
- celule tumorale	+	+	+	-/+
- eritrocite	+	+	+	+
Eliberarea de mediatori:				
- enzime lizozomale	?	+	+	+
- TNFα	+	+	+	?
- IL-1	+	+	?	?
- IL-6	+	+	?	?
Activarea prezentării antigenului	+	+	+	?
Reglarea sintezei de imunoglobuline	-	+	-	-

stafilococice există un prag scăzut de asemenea receptori, care competiționează cu Fc inhibând fagocitoza opsonică a granulocitelor PMN.

**Receptorii Fc pentru IgE (FcεR)** sunt prezenți pe membrana plasmatică a granulocitelor bazofile, eozinofile, a mastocitelor, trombocitelor și în mai mică măsură pe limfocitele B, o parte din limfocitele T, monocite și macrofage. Se cunosc două clase distincte: FcεRI și FcεRII (fig. 125). FcεRI este un receptor de mare afinitate, dar cu o distribuție restrânsă la un număr mic de tipuri de celule.

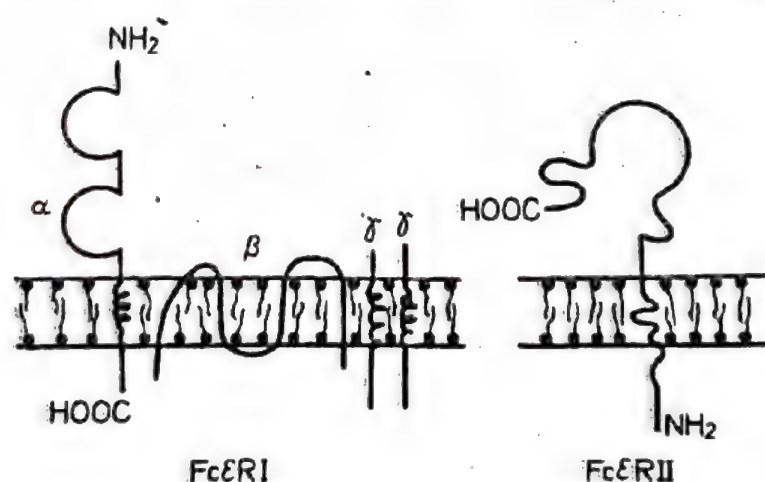


Fig. 125. Receptorii Fcε de tip I și II. FcεRI de tip imunoglobulinic, pentru a fi funcțional, are asociate lanțurile β și γ. Receptorul FcεRII este un monomer de tip lectinic (după W.H. Fridman).

Este prezent numai pe mastocite, pe bazofile și pe limfocitele capabile să lege moleculele de IgE. Are un lanț  $\alpha$  cu două bucle la nivelul domeniului extracelular care necesită, pentru a fi activ, asocierea cu alte două lanțuri,  $\beta$  și  $\gamma$  ale căror domenii intracitoplasmatică sunt absolut necesare pentru transmiterea informației. Există un singur lanț  $\beta$  care are ambele extremități,  $\text{NH}_2$  și  $\text{COOH}$  terminale, implantate în citoplasmă și două lanțuri  $\gamma$ . Are asociate tirozin-kinaza,  $\text{p56}^{\text{fyn}}$  și  $\text{pp60}^{\text{SRC}}$ .

Receptorul  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  există sub două forme moleculare:  $\text{Fc}\epsilon\text{RIIa}$ , cu afinitate redusă, constanta de legare fiind de  $10^6$ - $10^7 \text{ M}^{-1}$ , are o distribuție restrânsă, fiind prezent pe limfocitele B "virgine" și pe cele activate  $\mu^+\delta^+$ , dar nu pe cele care au comutat spre IgG sau IgA; pe monocite, macrofage, trombocite, eozinofile, celule dendritice și pe limfocitele T este exprimat  $\text{Fc}\epsilon\text{RIIb}$ .

$\text{Fc}\epsilon\text{RIIa}$  mediază endocitoza complexelor IgE-antigen de către limfocitele B, pe când  $\text{Fc}\epsilon\text{RIIb}$ , fagocitoza particulelor învelite cu IgE, acționând deci în situații în care pragul moleculelor IgE este mare, cum este cazul în bolile parazitare. Se pare că  $\text{Fc}\epsilon\text{RIIa}$  intervine în maturarea și activarea limfocitelor B, iar  $\text{Fc}\epsilon\text{RIIb}$  în răspunsul la alergene și paraziți.

Pe suprafața unei celule ar exista cca.  $10^5 \text{ Fc}\epsilon\text{RII}$ . Datorită distribuției sale largi în populațiile celulare ale organismului,  $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$  este și cel mai bine cunoscut. Este o glicoproteină de cca. 45 kD asociată spațial cu IgG de pe membrana limfocitelor B și cu HLA-DR, cu un situs de glicozilare la poziția 64 și unul de clivare la poziția 81 datorită căruia se poate desprinde de pe celulă și ajunge în circulație sub formă de fragmente de 35, 25 și 12 kD, fragmente care, deși libere, își păstrează totuși capacitatea de a lega moleculele IgE.  $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$  se prezintă sub forma unui lanț polipeptidic unic cu 321 reziduuri de aminoacizi, dintre care patru Cys, suficient pentru exprimarea funcției de receptor și legarea domeniului  $\text{C}\epsilon 3$  al IgE printr-o porțiune care ar corespunde aminoacidului din poziția 123 (v. fig. 125; fig. 126). Este o proteină de membrană de tip II, cu extremitatea  $\text{NH}_2$  inserată intracitoplasmatic. La om, cele două forme de  $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$  diferă între ele la nivelul extremităților  $\text{NH}_2$  intracitoplasmatic. Expresia  $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$  este favorizată de către moleculele libere de IgE și de către IL-4. Limfocitele B, de exemplu, exprimă de 50 de ori mai mult  $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$  când sunt stimulate cu IgE și IL-4 și numai de 35 de ori când sunt stimulate numai cu IgE sau numai cu IL-4. Agenții care inhibă sinteza IgE, cum ar fi IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ,  $\text{PGE}_2$  și alții, blochează inducerea și exprimarea  $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$ .

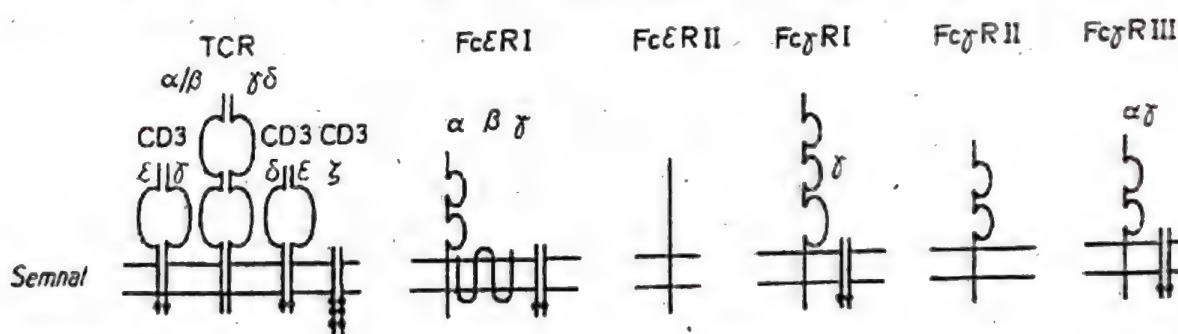


Fig.126. Asemănări și deosebiri între receptorii pentru antigen de pe membrana limfocitelor T și receptorii pentru Fc ( $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ ,  $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$ ,  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ ,  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ ,  $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ ).

**Receptorii pentru IgM ( $\text{Fc}\mu\text{R}$ )** sunt prezenți pe limfocitele B, pe monocite, macrofage și pe o parte din limfocitele T în repaus care exprimă receptori E de mare afinitate pentru hematiile de oaie. Unii susțin că acești receptori ar fi exprimați numai pe celulele T ajutoare. Au aviditate pentru domeniul  $\text{C}\mu 4$  al moleculei de IgM, putând fi evidențiați numai după o prealabilă incubare de câteva ore *in vitro*. Sunt sensibili la acțiunea tripsinei și pronazei. La nivelul limfocitelor T ar fi o tranziție



$Fc\gamma R \rightarrow Fc\mu R$  dependentă de nivelul glicozilării proteinelor, inhibiția glicozilării favorizând exprimarea  $Fc\gamma R$ , iar activarea ei, exprimarea  $Fc\mu R$ .

**Receptorii pentru moleculele IgA ( $Fc\alpha R$ )** sunt proteine de tip imuno-globulinic cu două "bucle" extracelulare, un domeniu transmembranar și unul intracitoplasmatic, fără alte lanțuri asociate. Au greutatea moleculară de 50-70 kD și leagă atât moleculele IgA serice cât și pe cele secretorii, cu o constantă de afinitate de  $5 \times 10^7 M^{-1}$ . Se găsesc pe granulocitele neutrofile, pe monocite, macrofage, limfocite B. Exprimarea lor pe membrana neutrofilelor este activată de prezența moleculelor de IgA și controlată de diferiți factori. De exemplu, GM-CSF sau G-CSF induc schimbări în afinitatea acestor receptori în sensul că celulele încep să exprime  $Fc\alpha R$  de mare afinitate. Rezistă la acțiunea proteinazelor. Legarea moleculelor de IgA la  $Fc\alpha R$  ar stimula multe funcții ale celulei: producerea moleculelor toxice de oxigen, fagocitoza etc.

Receptorii pentru  $Fc$  ai moleculelor de imunoglobulină sunt implicați în declanșarea unor diverse funcții celulare care depind atât de tipul de celulă pe care sunt exprimați cât și de natura receptorului. Astfel mastocitele, după legarea fragmentului  $Fc$  la  $FcR$ , eliberează diverși mediatorii celulari; macrofagele și polimorfonuclearele fagocitează particulele opsonizate, celulele  $K$  își activează sistemul litic anticorp-dependent etc.  $FcR$  intervin în catabolizarea și eliminarea imunoglobulinelor îmbătrânite prin fagocitarea opsonică a complexelor formate de către moleculele de imunoglobuline denaturate recunoscute specific de către anticorpi anti-aceste molecule, în transportul transplacentar al moleculelor de IgG sau transintestinal și transhepatic al celor IgA etc. Ar avea un rol important în reglarea răspunsului imun datorită acțiunii lor asupra limfocitelor  $T$  ajutătoare,  $T$  supresoare sau datorită modului lor de a interfera cu procesele activatoare ale limfocitelor  $B$ .

Le revine un rol important în citotoxicitatea anticorp-dependentă (ADCC), care este un mijloc de apărare atât împotriva celulelor eukariote cât și împotriva unor paraziți. Mulți receptori, ca de pildă  $Fc\epsilon RII$ , activează eliberarea mediatorilor cu rol în procesele inflamatorii. Tot ei au rol critic în proliferarea limfocitelor  $B$  indusă de IL-4, dar nu de alte limfokine.

În afară de rozetele EA,  $FcR$  mai pot fi identificați cu ajutorul rozetelor ES (eritrocite cu proteina A stafilococică) sau prin tehnici de imunofluorescență în care se folosesc molecule de imunoglobuline marcate cu izotiocianat de fluoresceină.

#### RECEPTORII PENTRU COMPLEMENT (CR)

Pe membrana celulelor există peste 15 structuri capabile să interacționeze cu proteinele rezultate din clivarea sistemului complement. Unele dintre acestea au rol în reglarea funcțiilor complementului iar altele servesc ca receptori de tip 1, 2 sau 3 (CR1, CR2, CR3).

CR1 leagă C1q, C3b, C4b, CR2 leagă iC3b (produsul de clivaj al C3b de către factorul I și cofactorii săi) exprimat pe limfocitele  $B$ , iar CR3 leagă iC3b exprimat pe granulocite și macrofage. Cel mai răspândit și mai bine studiat este CR1, prezent pe limfocitele  $B$ , trombocite, celule endoteliale, fibroblaste etc. Este un complex macromolecular glicoproteic cu greutatea de 60-70 kD care conține cca. 23% acid uronic și cca. 21% galactozamină.

Pe membrana unor celule, cum este cazul limfocitelor  $T$ , există un număr mic de receptori pentru complement care leagă 1-2 din componentele acestuia, în timp ce pe alte celule, cum ar fi granulocitele PMN, sunt exprimați în număr mare receptori pentru mai multe componente ale complementului. CR fixează atât com-

ponentele omoloage ale complementului cât și pe cele heteroloage, fenomenul putând fi evidențiat prin tehnica rozetelor EAC, în care celulele bănuite a fi CR<sup>+</sup> sunt incubate cu hematii în amestec cu ser imun anti-hematii și complement deficitar în componenta C5, pentru a se evita liza hematiilor (EAC = eritrocite + anticorp + complement).

Spre deosebire de receptorii pentru Fc, receptorii pentru complement sunt sensibili la acțiunea tripsinei și au multiple funcții biologice, dintre care încă multe sunt insuficient cunoscute. Ar interveni în reacții de citotoxicitate mediată celular, permițând celulei efectoare distrugerea țintei care a fixat anticorpul IgM și unele fracțiuni ale complementului, ar facilita eliminarea celulelor îmbătrânite, ar elibera semnale amplificatoare necesare activării celulelor B care au interacționat cu antigenul etc. (tabelul 83).

Tabelul 83

**Receptori pentru unele componente ale complementului pe membrana diferitelor celule. Efectul recunoașterii ligandului de către receptori asupra celulelor respective**  
(după D. Fearon și W. Wong)

Receptorul	Tipul de celulă pe care este exprimat	Nr. de receptori pe o celulă	Răspunsul celulei la interacția ligand+receptor
C <sub>1q</sub>	Neutrofile Monocite Celule K Limfocite B	? ? ? ?	Activarea proceselor oxidative și a citotoxicității ADCC
C <sub>3a</sub> C <sub>4a</sub>	Mastocite Polimorfonucleare Mușchi netezi	? ? ?	Eliberarea histaminei și a altor amine vasoactive
C <sub>3b</sub>	Eritrocite Neutrofile Monocite/macrofage Eozinofile Pe 15-20% din limfocite T	500-600 20 000-40 000 20 000-40 000 ? Nr. foarte mic	Eliminarea complexelor imune, activarea fagocitozei
C <sub>3c</sub>	Celule Daudi	?	?
C <sub>3e</sub>	Neutrofile Morfonucleare	600 000-700 000 70 000-80 000	Activarea eliberării precursorilor medulari
C <sub>5a</sub>	Mastocite Neutrofile Bazofile Eozinofile Monocite/macrofage	? 40 000-50 000 ? ? ?	Sinteza și secreția leukotrienilor, activarea chemotaxiei, a exprimării receptorului C <sub>3b</sub>
Factorul H	Limfocite B Monocite Neutrofile	? 40 000-4 000 000 40 000-4 000 000	Activează procesele oxidative, secreția factorului I, proliferarea la mitogene



Fixarea unor componente ale complementului, fie direct la bacterii, fie la molecule de anticorp care s-au fixat specific pe acestea, accelerează eliminarea lor prin procese de fagocitoză opsonică. Receptorii de tip CR2 de pe limfocitele *B* ar amplifica răspunsul proliferativ al acestora la stimulii antigenici.

#### RECEPTORUL PENTRU ERITROCITE DE OAI (RECEPTORUL E SAU RE)

Este un monomer de 50 KD prezent pe limfocitele *T*, făcând parte, ca moleculă accesorie, din receptorul pentru antigeni al acestor celule. Este un marker limfocitar *T*. Leagă spontan eritrocitele de oaie, proces cunoscut sub denumirea

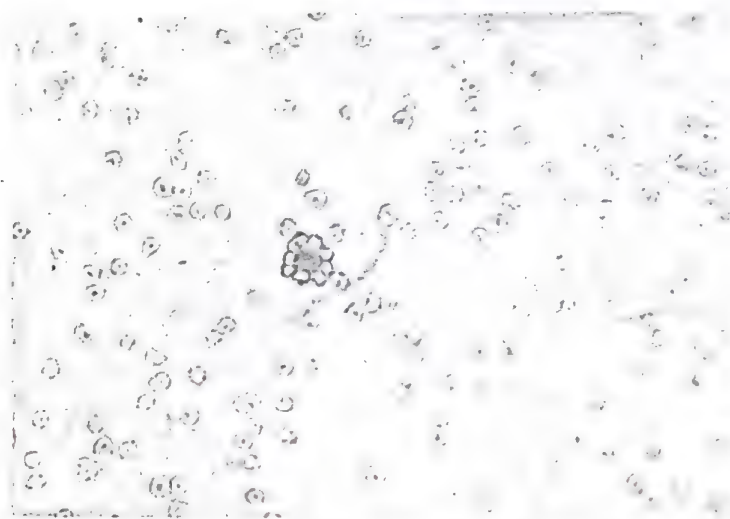


Fig.127. "Rozetă" formată de limfocitul *T* uman care a legat prin receptorul E (CD2) hematiile de oaie.

de rozete E (fig. 127). Legarea nu este un simplu fenomen fizic, ci o interacție în care sunt antrenate mecanisme complexe, activitatea receptorului putând fi modulată de către diferiți factori care intervin modificând structura membranei celulare. Se desprind de pe membrană ajungând în circulație, în cantități foarte mici la persoanele normale, dar destul de mari la cele cu depresii imune și în special la leucemii limfatice cronice, melanoame, sarcoame, boala Hodgkin etc. Forma sa solubilă are un efect supresor asupra răspunsului imun și asupra răspunsului limfocitelor *T* la stimulii policlonali *in vitro*, interferând cu activitatea polimerazei ADN. Poate fi desprins experimental de pe celule prin tratarea acestora cu KCl 3M, prin incubarea timp de o oră la +45°C, prin proteoliză enzimatică cu tripsină sau chimotripsină sau prin blastogeneză. Rezistența la tratamentul termic este o caracteristică a acestui receptor atunci când este exprimat pe limfocitele CD8<sup>+</sup>, caracteristică ce poate fi utilizată ca un mijloc relativ comod de identificare a populațiilor de limfocite *T* supresoare din circulație. Receptorul E (CD2) are un rol important în cooperarea limfocitelor *T* cu celulele prezentatoare de antigen (APC), realizând legarea LFA-3 de pe membrana APC și conexiunile între cele două celule în vederea transmiterii informației despre antigen celulelor *T*.

Este exprimat pe toate celulele prokariote sau eukariote care se multiplică activ: bacterii, celule embrionare, limfocite stimulate, celule neoplazice etc., fiind un component esențial pentru legarea transferinei, o glicoproteină care fixează ionii de Fe ce vor servi celulei ca sursă de energie. Receptorul este un dimer de tip lectinic constând din două subunități identice, a câte 95 kD, legate între ele prin legături disulfidice, fiecare receptor putând lega două molecule de transferină, proteina majoră de transport a  $\text{Fe}^{2+}$ . Domeniile extracitoplasmatic și transmembranar au câte patru reziduuri Cys. După atașarea la receptor, complexul transferină- $\text{Fe}^{2+}$  este internalizat,  $\text{Fe}^{2+}$  fiind desprins în vederea stocării lui iar receptorul, care încă mai are legată transferina, exprimat pe suprafața membranei și apoi eliminat prin clivaj enzimatic. Eritrocitele imature, limfocitele activate, celulele neoplazice necesită  $\text{Fe}^{2+}$  pentru replicarea lor, în care scop exprimă pe membrană receptori pentru transferină.

Cu toate că transferina se găsește din abundență în ser, totuși, limfocitele normale din sângele periferic sau cele care sunt în repaus nu exprimă acest receptor. După stimularea lor, el este imediat exprimat, intensitatea exprimării fiind condiționată de semnalele extracelulare primite și de stadiile de activare în care se găsește celula. În cazul limfocitelor *T* stimulate cu mitogene, de pildă, ar fi următoarele seșvențe în modularea receptorilor pentru transferină: a) la celula în repaus, gena care codifică pentru acest receptor este blocată și, deci, inactivă; b) după contactul celulei cu lectina, gena este deblocată și se activează sinteza receptorului; c) exprimarea receptorului este amplificată de IL-2 exogenă care induce o depleție a ionilor de Fe intracelulari și necesitatea introducerii altor ioni din afara celulei.

Așadar, la celulele în repaus, genele care-i codifică sinteza, localizate pe cromozomul 3, nu se exprimă, sunt "tăcute". După stimul, funcția lor se activează, începe sinteza receptorului, exprimarea lui pe membrană, procese amplificate de către IL-2 exogenă, care au loc în faza de multiplicare  $G_1$  târzie și care sunt puternic inhibitate de către "calcitriol", un compus al vitaminei D. Efectul antiproliferativ al  $\text{IFN } \alpha$  asupra liniilor celulare limfoblastoide sau asupra limfocitelor stimulate *in vitro* cu PHA este consecința inhibiției exprimării receptorului pentru transferină. Receptorii leagă de preferință transferina omoloagă care a fixat ioni de Fe cu diferite valențe, de regulă  $\text{Fe}^{2+}$  sau  $\text{Fe}^{3+}$  dar, posibil și  $\text{Fe}^{1+}$  sau  $\text{Fe}^{5+}$ , jocul electronilor, trecerea ionilor de la o valență la alta constituind sursa de energie necesară celulei în faza activă de multiplicare. În cazul limfocitelor *T*, exprimarea receptorului pentru IL-2 o precede pe cea a receptorului pentru transferină.

Evidențierea receptorilor pe membrana celulelor se poate face prin metode radioizotopice, prin tehnici de rozetare cu eritrocitele la care s-a legat transferina cu ajutorul  $\text{CrCl}_3$ , prin tehnici de imunofluorescență etc. Rolul acestor receptori este de a asigura celula în cursul diviziunii cu o sursă bogată de energie conferită de ionii de Fe. Din această cauză, administrarea în scop curativ a medicamentelor pe bază de  $\text{Fe}^{2+}$  la pacienții cu boli neoplazice, în scopul remedierii anemiilor care sunt frecvent asociate acestor boli, este profund dăunătoare. Inocularea de preparate conținând Fe ar putea teoretic stimula eritropoieza și asigura hem-ul cu materialul necesar, dar șansele ca acesta să fie rapid preluat de către celulele neoplazice aflate în diviziune activă sunt mult mai mari, așa că terapia, în loc să ajute organismul, stimulează proliferarea tumorii.



Au rol în legarea diferiților mediatori solubili care controlează multiplicarea celulară sau exprimarea unor funcții ale ei. Mai bine cunoscuți sunt receptorii pentru interleukine, interferoni, TNF, diverși factori de stimulare a coloniilor, hormoni etc.

**Receptorii pentru interleukine.** A fost determinată secvența primară a aminoacizilor care alcătuiesc polipeptidele receptorilor pentru IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 etc. interleukine cu rol de adevărați hormoni care intervin activ în procesele inflamatorii și în reacțiile imune. Sunt cunoscute multe proprietăți ale receptorilor pentru unele dintre aceste citokine (tabelul 84), majoritatea lor aparținând familiei "hemopoietinei" sau superfamiliei "imunoglobuline" (fig. 128).

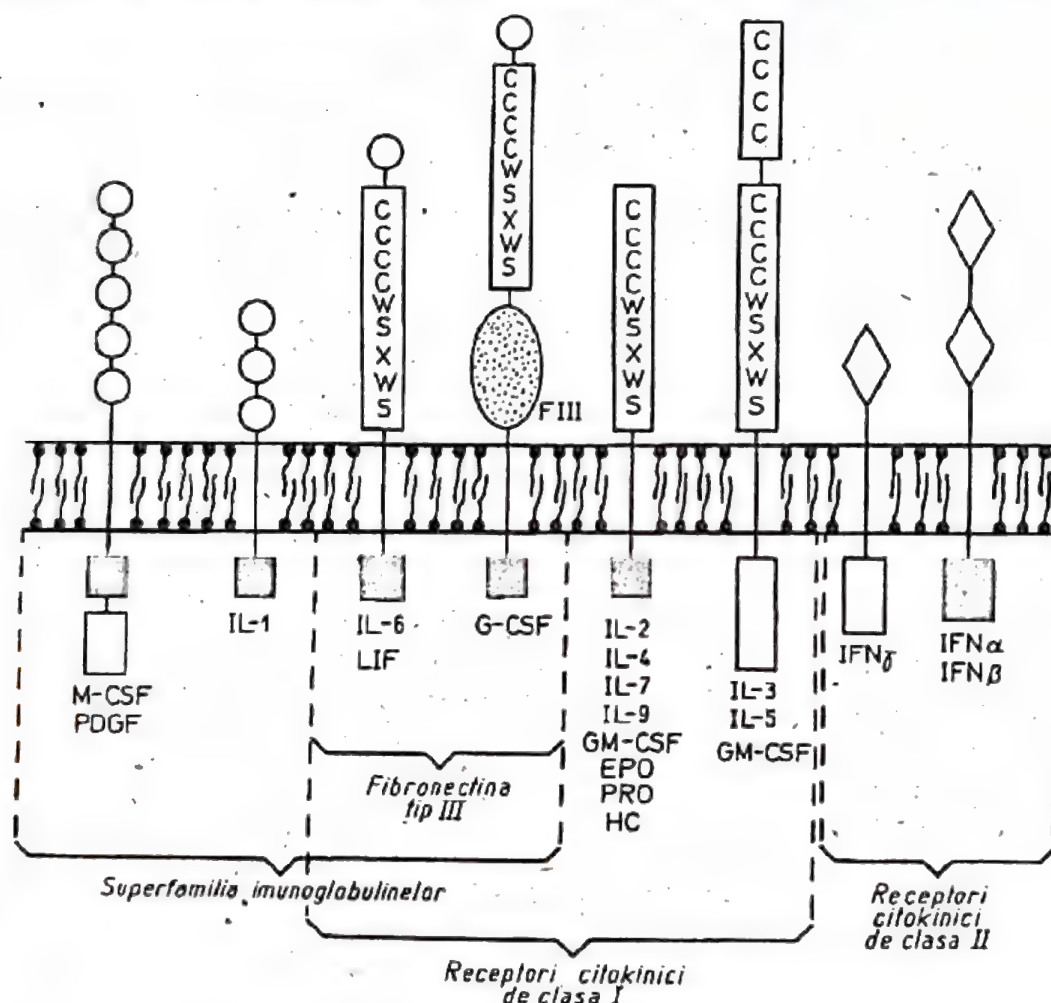


Fig.128. Superfamilia receptorilor de natură imunoglobulinică și citokinică de clasele I și II.

Receptorii din familia "hemopoietine" exprimați pe suprafața celulelor sistemului imun sunt IL-2 R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R și GM-CSFR. Toți sunt glicoproteine implantate în membrana celulară, cu extremitatea NH<sub>2</sub> terminală orientată extracelular și cu un domeniu transmembranar hidrofob. Domeniul extracelular are 4 reziduuri Cys (cu excepția IL-7R care are numai două reziduuri Cys) și o secvență Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) localizată în apropierea domeniului transmembranar.

Unele proprietăți ale receptorilor pentru interleukine (după S.K.Dower și col.)

Receptorul pentru	Tipul sau subunitatea	Greutatea moleculară (kD)	Afinitatea pentru ligand ( $M^{-1}$ )	Nr./celulă	Distribuția celulară
IL-1	Tip I Tip II	60 - 80	$10^8 - 10^{10}$	$10^2 - 10^4$	Limfocite, fibroblaste, keratinocite, hepatocite, celule tumorale
IL-2	IL-2R $\alpha$ IL-2R $\beta$ Complex $\alpha\beta$	55 75	$10^7 - 10^8$ $10^8 - 10^9$	$10^3 - 10^5$ $10^3 - 10^4$ $10^{11} - 10^{12}$	Monocite, limfocite T și B activate
IL-3	-	120 - 140	$5 \times 10^7$	$10^2 - 5 \times 10^3$	Celule din seria mieloidă, limfocite B
IL-4	-	140	$1 - 2 \times 10^{10}$	$10^2 - 5 \times 10^3$	Diferite linii celulare, fibroblaste, limfocite T, B etc.
IL-5	-	46,5	$10^8$	$10^3 - 10^4$	Limfocite B activate, eozinofile
IL-6	-	80	$10^9 - 10^{10}$	$10^2 - 10^4$	Diferite linii celulare, fibroblaste, limfocite T, B etc.
IL-7	-	70 - 75	$1 \times 10^{10}$	$10^2 - 10^4$	Celule din seria mielomonocitară, celule T, fibroblaste, pre-B
IL-8	-	65 și 150	$10^9$	$10^3 - 10^4$	Granulocite / macrofage

Receptorii din superfamilia imunoglobulinelor includ receptorii pentru antigen de pe limfocitele B, lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$  ale receptorilor pentru antigen de pe membrana plasmatică a limfocitelor T, moleculele MHC de clasa I și II, lanțurile polipeptidice ale CD4 și CD8, CSF-R, IL-1R, PDGF-R și IL-6R. De fapt, IL-6R aparține atât familiei hemopoietine cât și superfamiliei imunoglobuline de receptori. Receptorii acestei superfamilii au domeniile extracelulare cu legături disulfidice intralanț care, exact ca și la moleculele de imunoglobuline, formează "bucle". Ca și în cazul membrilor familiei hemopoietine, membrii superfamiliei imunoglobuline sunt asemănători numai la nivelul domeniului extracelular unde au conformație similară imunoglobulinelor, dar nu și la nivelul domeniului



intracitoplasmatic. Mulți dintre ei se găsesc ca receptori, ancorați în membrana plasmatică a celulelor sau sub formă solubilă, care pot competiționa cu cei ficși în legarea citokinelor formând complexe receptor solubil/citokină.

**Receptorul pentru IL-1** este o glicoproteină care leagă atât moleculele de IL-1 $\alpha$  cât și pe cele de IL-1 $\beta$  și care aparține superfamiliei imunoglobuline. Gena care-i controlează sinteza este pe cromozomul 2. Ar exista două tipuri de receptori diferiți care ar transmite intracelular semnalele pe căi diferite: receptorul de tip I, cu greutatea moleculară de 80 kD, exprimat pe limfocitele T, fibroblaste și celule endoteliale, și receptorul de tip II de 60-65 kD exprimat pe celulele T activate, pe B, monocite, granulocitele PMN și pe placentă. Ambele tipuri sunt similare la nivelul domeniilor extracelulare, dar se deosebesc la nivelul celor intracitoplasmatic. Tipul I are un segment intracitoplasmatic lung, cu 215 reziduuri de aminoacizi, iar tipul II are un segment scurt, doar de 29 reziduuri (fig. 129).

Se pare că pe o celulă există un număr mic de receptori cu afinitate de legare mare, dar această situație nu influențează negativ activarea celulei, deoarece pentru aceasta sunt necesare doar 1-10 molecule de IL-1, adică este suficient să fie interesați doar 1-10 receptori. De altfel, numărul lor pe celulă variază în funcție de tipul celulei și de stadiul ei de activare. Pe timocite sunt cca. 10 receptori iar pe celulele T cca. 40 pentru ca după activare, numărul lor să crească de cca. 10 ori. În momentul în care molecula de IL-1 s-a fixat la IL-1R, se transmit intracelular semnale care induc activarea proteinkinazelor, creșterea pragului intracelular al cAMP urmată de activarea unei proteine identice cu NF-kB și fixarea pe ADN. Totodată, au loc activarea fosfolipazei C (PLC) legată la fosfatidil-etanol-amină, activarea influxului de Na<sup>+</sup>, producerii de diacilglicerol (DAG), exprimarea unor gene oncogene activatoare ale metabolismului și multiplicării celulare (c-fos, c-myc, c-jun) etc.

Prezența IL-1R pe suprafața diferitelor celule este influențată de alte citokine, care de regulă îi stimulează intensitatea exprimării. Este cazul GM-CSF, G-CSF, IL-4, PDGF etc. Inocularea *in vivo* a IL-1R solubil modulează funcțiile imune blocând hiperplazia ganglionilor limfatici la animalele inoculate cu celule alogene și întârziind rejecția alogrefelor.

**Receptorul pentru IL-2** este un complex format din lanțurile  $\alpha$ , cu greutatea moleculară de 55 kD și afinitate înaltă de legare, și lanțurile  $\beta$ , de 70-75 kD, cu afinitate joasă de legare, legate între ele prin legături disulfidice. Heterodimerul  $\alpha\beta$  are regiuni variabile și constante, similare moleculei de imunoglobulină. Gena care-i controlează sinteza este localizată pe cromozomul 10 și are 8 exoni și 7 introni. Întreaga moleculă are 272 de reziduuri de

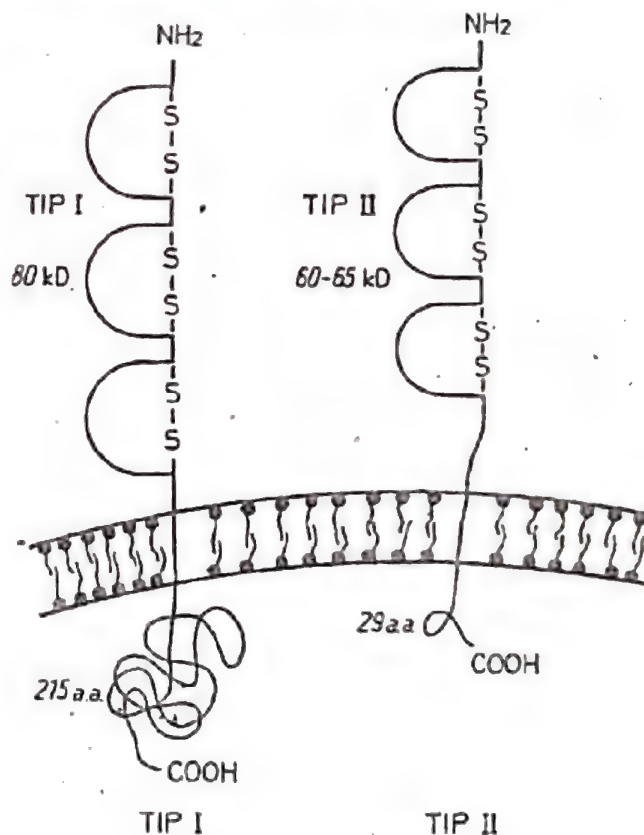


Fig.129. Receptorii pentru interleukina-1 (IL-1R) de tip I și II.

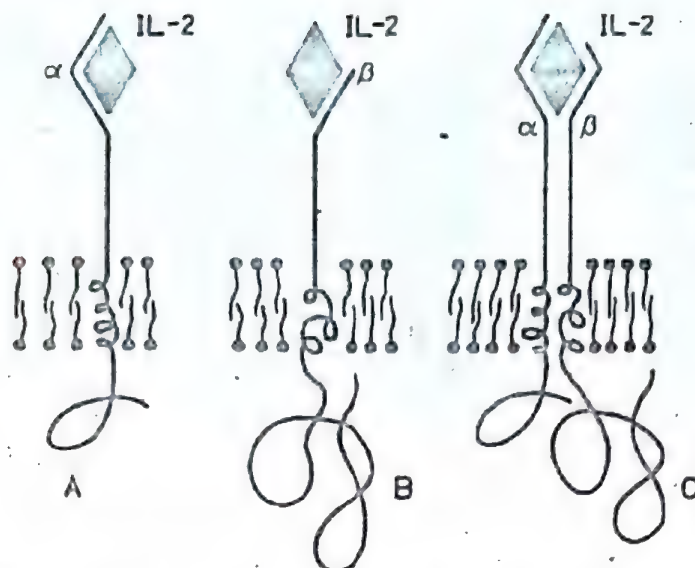


Fig.130. Posibilitățile ipotetice de realizare a variației de intensitate în legarea IL-2 la receptorul ei.

- A. Lanțul  $\alpha$  leagă IL-2 pe o suprafață mai mare, realizând o afinitate de legare bună.
- B. Lanțul  $\beta$  fixează o suprafață mică, din care cauză leagă slab interleukina.
- C. Ambele lanțuri realizează o legare puternică.

aminoacizi, cu 13 reziduuri de cys și cu un domeniu intracitoplasmatic scurt, de numai 13 reziduuri, în care este prezentă serina cu rol în fosforilare. Când sunt împreună, lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$  formează un complex care leagă IL-2 cu afinitatea foarte mare (fig. 130). Lanțul  $\alpha$  este exprimat pe celulele în repaus, exprimarea lui crescând de 2,5 ori după stimularea celulelor, iar lanțul  $\beta$  este prezent numai pe suprafața celulelor stimulate, dar nu și pe cele în repaus. Receptorii pentru IL-2 nu sunt prezenți în permanență pe membrana plasmatică, exprimarea lor fiind condiționată de stimularea antigenică a limfocitelor. La nivelul limfocitelor T activate și fosforilate numai în prezența IL-2, prima exprimată este oncogenă c-myc, după care este activată gena care controlează sinteza IL-IR, însoțită de producerea de IFN $\gamma$  și, ulterior, gena pentru transferină. Moleculele de IL-2, PHA, PMA sunt activatori ai exprimării lanțului  $\alpha$  al IL-2 R.

Forma sa solubilă, cu greutatea de 40 kD, se găsește în cantități mari în serul pacienților cu diferite boli, cum ar fi boala Hodgkin, leucemia limfatică cronică (LLC), leucemia cu "celule păroase" (hairy cell leukaemia), sindromul Sezary etc. Nivelul său seric are valoarea prognostică, scăderea spre limite normale fiind de bun augur.

**Receptorul pentru IL-3** este o glicoproteină de 72-140 kD prezentă pe suprafața celulelor din seria mieloidă și pe suprafața limfocitelor B. Are greutatea moleculară fie de 72,5 kD fie de 140 kD dar, după incubarea celulelor la 37°C în prezența IL-3, are loc conversia proteinei de la 140 kD la 72,5 kD.

**Receptorul pentru IL-4** este o proteină de 139-140 kD cu afinitate mare de legare, a cărei exprimare este inhibată de ciclosporina A, dar este puternic activată consecutiv stimulării celulelor cu lectine. Larg răspândit pe diferite tipuri de celule, acest receptor (IL-4R) are un domeniu extracelular, unul transmembranar și unul intracitoplasmatic. Există și o formă solubilă a IL-4R care are aceeași afinitate de legare ca și forma fixă și care ar inhiba efectul stimulator al limfocitelor IL-4 asupra limfocitelor B.

**Receptorul pentru IL-5 (IL-5R)** este mai puțin cunoscut la om fiind, ca și IL-8R și TGF-R, mai bine studiat la șoarece. Are o mare analogie cu IL-3R, de care însă diferă prin greutatea moleculară. Ar exista IL-5R cu diferite afinități de legare.



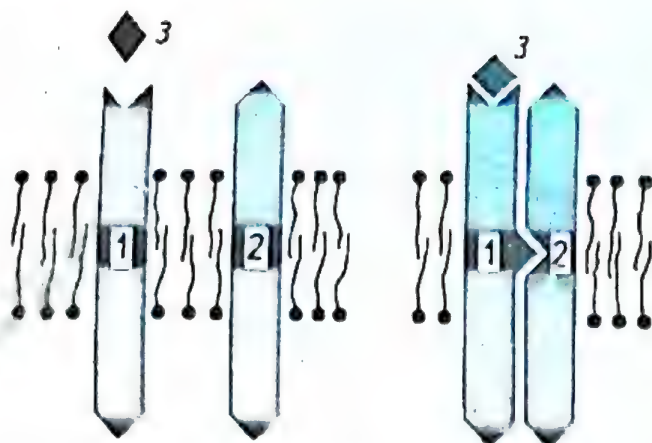


Fig.131. Receptorul pentru IL-6.

A. La celula în repaus, receptorul pentru IL-6 (1) este distanțat de glicoproteina gp 130 transductoare a semnalelor (2).

B. Legarea IL-6 (3) la receptor (1) induce apropierea acestuia de gp 130 și o modificare sterică a lui, permițând astfel transmiterea semnalului (după Hirano și col.)

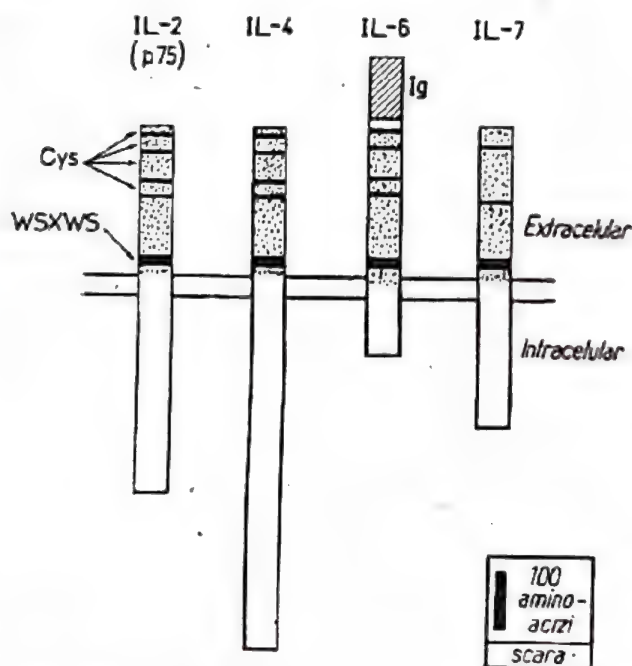


Fig.132. Receptorii pentru Interleukina la om, care fac parte din familia receptorilor hemopoietinici. Barele orizontale subțiri reprezintă reziduurile de Cys iar cele groase WSXWS (Trp-SerXTrp-Ser) (după S.K.Dower și col.).

La subiecții normali, forma solubilă a IL-6R este eliminată prin urină.

Receptorul pentru IL-7 (IL-7R) a fost clonat recent, dovedindu-se a fi un membru al familiei de receptori citokinici. Se găsește atât ca formă fixă, de receptor membranar cât și ca formă solubilă (fig. 132).

Receptori pentru factori de stimulare a coloniilor (CSF-R) sunt glicoproteine care au omologie cu familia imunoglobulinelor. Au un domeniu NH<sub>2</sub> extracelular, unul transmembranar hidrofob și unul intracitoplasmatic, cu lungimi variabile și

Receptorul pentru IL-6 (IL-6R) este exprimat pe celulele limfoide și nelimfoide, ca o expresie a activității multifuncționale a acestei interleukine. De asemenea, este exprimat pe limfocitele B activate (100-600 receptori/celulă), dar nu pe B în repaus. Pe limfocitele T, este exprimat atât pe celulele activate cât și pe cele în repaus (100-1000 receptori/celulă). Este o glicoproteină de 80 kD cu 449 reziduuri de aminoacizi și cu două domenii extracitoplasmatic, dintre care unul cu 90 reziduuri ar aparține superfamiliei imunoglobulinelor, iar altul superfamiliei citokinelor (vezi fig. 128), fiind similar IL-12R. Domeniul transmembranar are 28 reziduuri de aminoacizi, iar cel intracitoplasmatic cca. 82 de reziduuri. Domeniul intracitoplasmatic nu este esențial pentru transmiterea semnalelor, deoarece nu are situsuri de legare nici pentru proteinkinaze nici pentru proteina G, așa că nu este capabil să transmită mesajele primite din exterior. Transmiterea acestora este realizată de către o glicoproteină accesorie cu greutatea moleculară de 130 kD, care are 6 unități de molecule de fibronectină de tip III și un situs de legare pentru proteina G. La celula în repaus, această glicoproteină este distanțată de receptor, pentru ca în momentul activării să se apropie și să preia transmiterea intracelulară a semnalelor (fig. 131). Domeniul citoplasmatic al acesteia are 277 de reziduuri de aminoacizi, deși primii 61 de lângă membrană sunt suficienți pentru transmiterea semnalelor activatoare.

fără activitate kinazică (cu excepția M-CSF). Toți sunt foarte asemănători la nivelul unei regiuni de 210 reziduuri de la nivelul domeniului extracelular care fixează specific ligandul (fig. 133).

**Receptorul pentru factorul de stimulare a coloșilor de macrofage (M-CSFR)** este o glicoproteină de 165 kD cu activitate tirozin-kinazică, identică produsului proto-oncogenei c-fos, exprimată în principal pe membrana monocitelor și macrofagelor, dar și pe membrana trofoblaștilor și celulelor Kupffer active. Exprimarea lui este necesară pentru diferențierea precursorilor în secvența precursor → monoblast → promonocit → monocit → macrofag. Numărul lor crește în cursul maturării celulelor.

**Receptorul pentru factorul de stimulare a granulocitelor și macrofagelor (GM-CSFR)**, cu greutatea moleculară 51 kD, este mai bine cunoscut la șoarece, unde ar exista două tipuri: unul de mare afinitate și altul cu afinitate slabă pentru ligand. Este bine reprezentat pe celulele blastice imature, dar numărul lor scade o dată cu maturarea celulei, ajungând la maximum 1000/celulă. Este foarte asemănător cu IL-3R. La om, este exprimat pe celulele hematopoietice - granulocite, monocite, macrofage - și nehematopoietice, cum ar fi unele celule carcinoame, melanomatoase, celule ale placentei etc. Numărul lor este relativ mic, variind între 50 și 800 de receptori/celulă. După unii, ar exista un receptor unic, cu greutatea de cca. 130 kD, foarte sensibil la acțiunea proteazelor celulare.

**Receptorul pentru factorul de stimulare a granulocitelor (G-CSFR)** este o glicoproteină cu greutatea moleculară de 160 kD, foarte asemănătoare structural și funcțional cu GM-CSFR.

**Receptorul pentru factorul de creștere a epitelilor (EGFR)** are greutatea moleculară de 170 kD, un domeniu transmembranar și unul citoplasmatic, tirozin-kinazic. Fixarea ligandului (EGF) la domeniul extracelular generează procesele de autofosforilare prin transmutarea  $P^{3+}$  către tirozin-kinază și creșterea masivă a nivelului intracelular al fosfotirozinei.

**Receptorul pentru factorul de activare a trombocitelor (PAF)** este o proteină care traversează membrana plasmatică de mai multe ori (fig. 134). Se găsește pe suprafața trombocitelor și a granulocitelor PMN, legat la proteina G. Mediază căile de transmitere a semnalelor, activează PLC, influențează nivelul celular al  $Ca^{2+}$  chemotaxia, eliberarea speciilor toxice de oxigen etc.

Una dintre cele mai interesante ipoteze care încearcă să explice mecanismele care stau la baza transmiterii transmembranare a semnalelor este fosforilarea receptorilor pentru factorii de creștere. De exemplu, după legarea EGF, G-CSF, insulinei etc. la receptorii lor, are loc autofosforilarea și activarea tirozin-protein-kinazei, fosforilarea reziduurilor tirozin-kinazice putând juca un rol important în reglarea creșterii și diferențierii celulare. Toți acești receptori au un domeniu

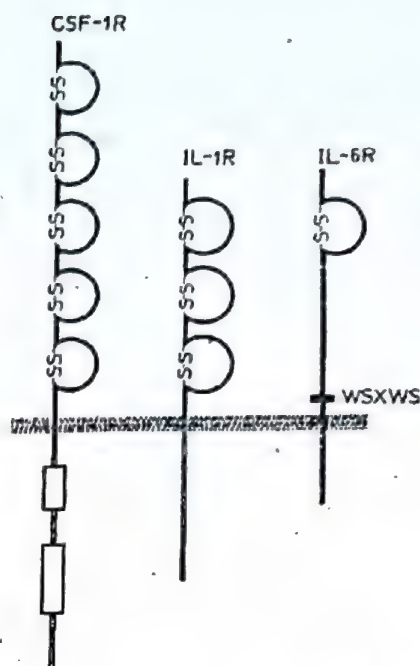


Fig.133. Receptori din familia superimunoglobulinelor. Domeniile imunoglobulinice formează, datorită reziduurilor conservate, bucle generate de legăturile -S-S-. Receptorul pentru IL-6 are conservate și WSXWS. Dreptunghiurile domeniului citoplasmatic al CSF-1R indică regiunile de atașare a tirozin-kinazei (după S.K. Dower și col.).



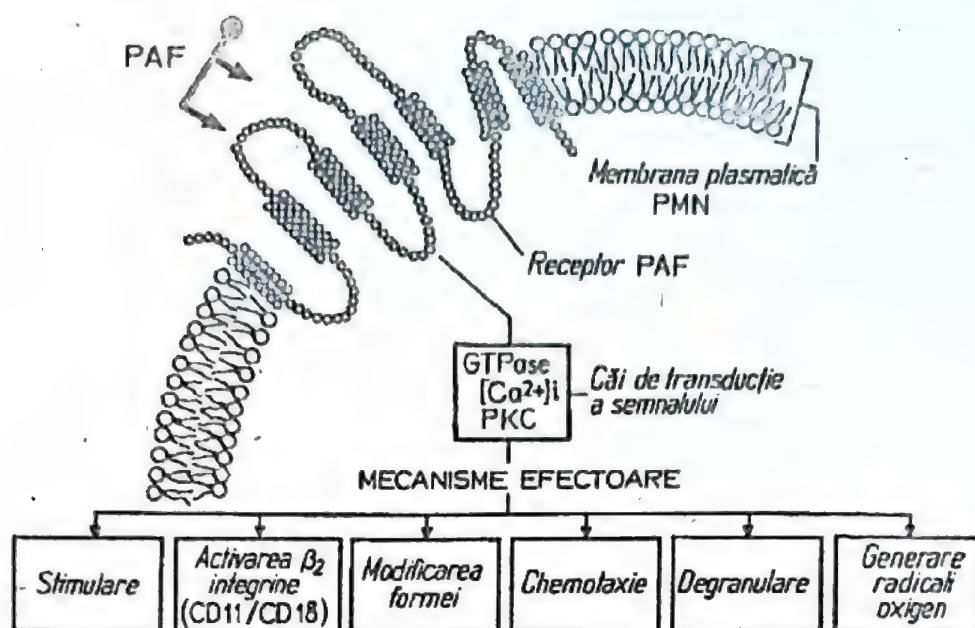


Fig.134. Receptorul pentru factorul de aglutinare a trombocitelor (PAF) de pe granulocitele PMN. PAF se leagă la un receptor de mare afinitate de la nivelul membranei PMN care traversează de 7 ori membrana plasmatică a acestor celule.

extracelular puternic glicozilat care fixează ligandul, un domeniu hidrofobic transmembranar și unul citoplasmatic care conține o regiune catalitică tirozin-kinazică.

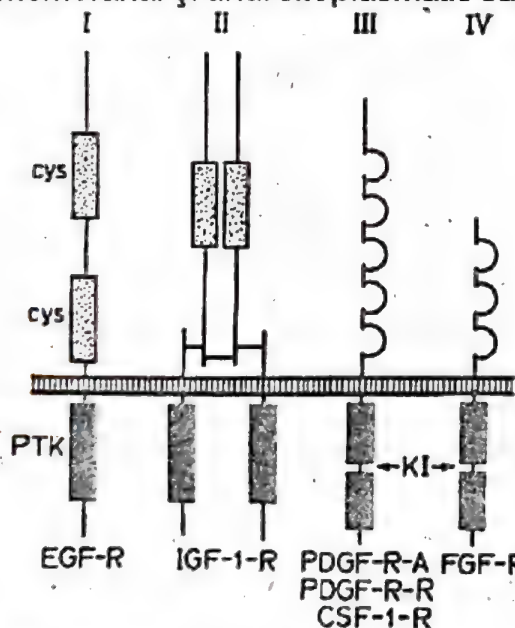


Fig.135. Reprezentarea plasmatică a celor patru subclase (I, II, III și IV) de receptori tirozin kinazici (după A. Ullrich și J. Schlessinger).

EGF-R = receptorul pentru factorul de creștere a epitelilor; IGF-1-R = receptor pentru insulină; FGF-R = receptorul pentru factorul de creștere a fibroblastelor; PDGF-R = receptorul pentru factorul de creștere a trombocitelor; KI = regiunea de inserție a kinazelor; CSF-1-R = receptorul pentru factorul de stimulare a creșterii celulelor.

Pe baza caracteristicilor lor structurale, acești receptori au fost încadrați în patru grupe diferite: grupa I cu două regiuni extracelulare bogate în reziduuri de cys, grupa II cu câte două lanțuri (heterodimer  $\alpha_2\beta_2$ ), și secvențe bogate în cys, și grupele III și IV cu 5, respectiv 3 regiuni extracelulare asemănătoare imunoglobulinelor și cu domeniile citoplasmice ale protein-tirozin-kinazelor întrerupte (fig. 135). Aceste grupe de receptori prezintă diferite modificări și transpoziționări ale domeniilor lor după fixarea liganzilor (fig. 136).

**Receptorii pentru Interferoni (IFN-R).** Se cunosc doi receptori: unul de tip I, sau cu greutatea moleculară de 110-140 kD, a cărui sinteză este controlată de către gene situate pe cromozomul 21, care leagă IFN $\alpha$  și IFN $\beta$  și altul de tip II, sau cu greutatea moleculară de 95-110 kD, cu gena pe cromozomul 6, care leagă IFN $\gamma$ . Numărul lor este relativ mic, de cca. 200-10 000 de receptori/celulă, cu constanta de legare între  $1 \cdot 10^{-9}$  și  $1 \cdot 10^{-10}$  M. Atât numărul cât și afinitatea lor se modifică în funcție de stadiul de diferențiere și proliferare a celulei.

Legarea IFN la receptori este necesară, dar nu suficientă pentru activarea celulei, aceasta solicitând și alți stimuli. Totuși, dacă lipsește stimulul transmis prin IFN-R, atunci răspunsul antiviral al celulei este inhibat. După legarea la receptor, IFN induce o serie de modificări intracelulare, ca de pildă creșterea fosforilării, modificări care conduc la activarea unor răspunsuri fiziologice cum ar fi apărarea antivirală, inhibiția multiplicării, exprimarea antigenelor de histocompatibilitate etc.

La temperatura de 37°C are loc internalizarea complexelor IFN-IFN-R, internalizare inhibată de citocalazina B, care de altfel inhibă nu numai internalizarea dar și formarea complexelor, sugerând o asociere a acestora cu citoscheletul celular.

Unele ipoteze susțin că legarea IFN la receptori activează PLC, proces care conduce la clivarea fosfolipazelor inozitolice, activarea PKC, stimularea influxului de  $Ca^{2+}$  și sinteza de LT sau PG via acid arahidonic (fig.137). În final, se ajunge la inhibiția sintezei proteinelor și blocarea multiplicării celulare.

**Receptorii pentru factorul de necroză a tumorilor (TNF-R)** ar fi receptori de tip I și tip II, bogați în reziduuri cys, fiecare dintre ei putând lega atât  $TNF\alpha$  cât și  $TNF\beta$  (tabelul 85). Sunt între 1000-10 000 pe toate celulele eukariote, cu excepția

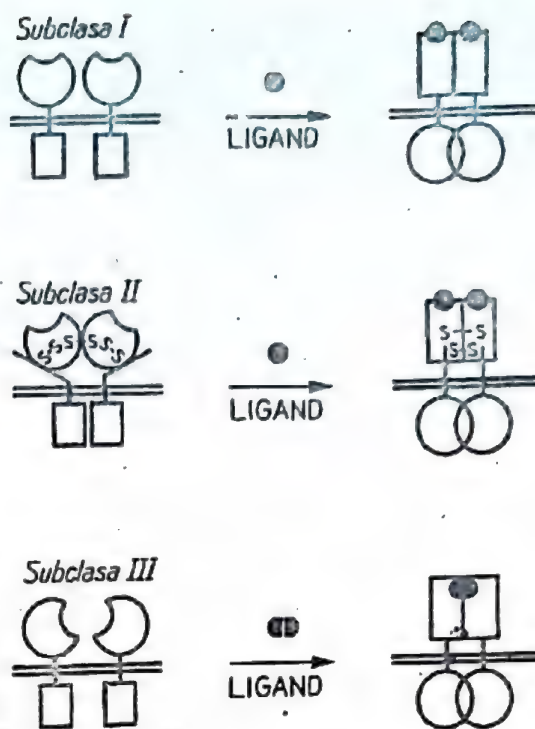


Fig.136. Modificări conformaționale ale unor subclase de receptori tirozin-kinazici, consecutiv fixării ligandului (după A. Ullrich și J. Schlessinger).

Tabelul 85

Principalele caracteristici fizico-chimice ale TNF-R

Caracteristica, funcția sau localizarea	TNF-R de tip	
	I	II
Cromozomul pe care este gena	12	1
Numărul de exoni	3	3 (?)
Numărul reziduurilor aminoacizilor la nivel:		
- total	455	461
- leader	29	22
- domeniul extracelular	182	235
- domeniul transmembranar	21	28
- domeniul citoplasmatic	223	176
Greutatea moleculară (kD)	55	75
Nr. reziduuri cisteină	24	cca. 20
Glicozilarea	prezentă	absentă



eritrocitelor, unul având greutatea moleculară de 55 kD, cu 182 reziduuri de aminoacizi în domeniul extracelular, 20-22 la nivelul segmentului transmembrar și 221-223 la nivelul domeniului intracitoplasmatic iar celălalt, cu greutatea de 75 kD și cu un domeniu intracelular mai scurt cu 50 de reziduuri de aminoacizi.

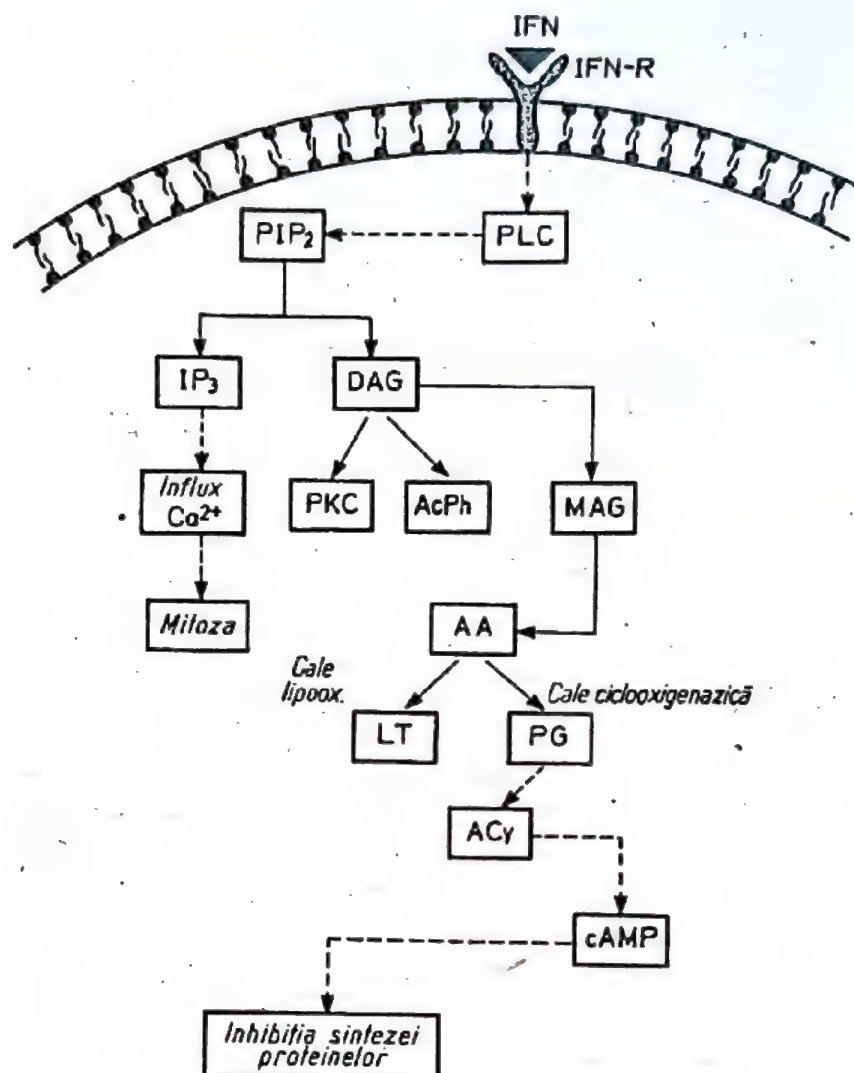


Fig.137. Reacții metabolice declanșate în citoplasma celulelor, consecutiv fixării interferonilor (IFN) la receptorii lor (IFN-R).

PLC = fosfolipaza C; PIP<sub>2</sub> = fosfatidil-inozitol-difosfat; IP<sub>3</sub> = inozitol trifosfat; DAG = diacilglicerol; PKC = protein-kinaza C; AcPh = acid fosfatidilic; AA = acid arahidonic; LT = leucotriene; PG = prostaglandine; ACy = adenilat-ciclaza; cAMP = adenzin-monofosfat-ciclic; MAG = monoacil glicerol.

———— = transformare, stimulare;

- - - - - = modificare, activare.

- Acești receptori sunt de fapt două ramuri distincte ale unei familii moleculare, omologia dintre ei fiind destul de redusă (28%), fiecare putând fixa TNF $\alpha$  sau TNF $\beta$ , fixare care este la originea activării factorului de transcriere NF-kB. Interesant este faptul că există o omologie mult mai mare (62-64%) între TNF uman și

murin de tip I sau II decât între tipurile I și II uman. Receptorul cu greutatea moleculară mai mare este exprimat predominant pe celulele din seria mieloidă, iar cel cu greutatea mai mică, pe celulele de tip epitelial. Ambii receptori sunt bine exprimați pe celulele neoplazice. Numărul lor pe suprafața celulelor nu este fix, fiind influențat de o serie de factori (tabelul 86).

Tabelul 86

Factori care stimulează sau inhibă exprimarea TNF-R pe membrana plasmatică a celulelor

Modificare numerică în sensul	Factorul care induce modificarea
Creșterii numărului de receptori	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Maturarea funcțională a celulei</li> <li>- Prezența activatorilor proteinkinazelor</li> <li>- Inductorii activării limfocitelor T</li> <li>- Sinteza IL-2</li> </ul>
Scăderii numărului lor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colchicina (provoacă depolarizarea mitocondriilor)</li> <li>- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> <li>- Vinblastina</li> <li>- Epinefrina</li> <li>- Insulina</li> <li>- Somatostatina</li> </ul>

Formele solubile de TNF-R au fost identificate în urină la subiecții normali și în serul bolnavilor de cancer, dar nu în serul subiecților normali. Este foarte posibil ca prezența receptorilor solubili în serul pacienților cu boli neoplazice să fie expresia unei forme de protecție a tumorii față de efectul toxic al TNF.

#### RECEPTORII PENTRU HORMONI

Sunt situați atât la suprafața membranei plasmactice cât și la nivelul citoplasmei sau chiar al nucleului, legarea hormonilor la receptori ducând la activarea sistemului enzimatic intracelular (v. tabelul 78).

Există receptori pentru glucocorticoizi cu rol antiinflamator, situați la nivelul citoplasmei, de unde complexul receptor-glucocorticoid este transferat la nucleu unde stimulează sinteza mRNA și, implicit, a proteinelor. Una dintre proteinele stimulate de către glucocorticoizi este "lipocortina" denumită și "anexina-1", un membru al familiei anexinelor cu rol în reglarea glucocorticoizilor și în controlul proceselor imune și inflamatorii. Lipocortina este un antiinflamator marcant, cu o puternică acțiune inhibitoare a fosfolipazelor și în special a PLA<sub>2</sub>. Receptorii pentru lipocortină sunt două proteine cu greutatea moleculară de 15 și 18 kD, exprimați pe monocite și granulocitele PMN, dar nu și pe limfocite.

La nivelul timocitelor și limfocitelor sunt receptori pentru ACTH, pentru endorfinele  $\alpha$  și  $\beta$ , pentru oxitocine, arginine, vasopresine, somatostatine, hormoni de creștere, insulină, histamină, serotonină, adenozină, hormoni tiroidieni etc. iar



macrofagele și limfocitele  $T_s$  au diferiți receptori de mare afinitate pentru oestrogeni (dietilstilbestrol). Mulți dintre acești hormoni pot activa doi receptori cu efecte diametral opuse. Astfel, adenzina în concentrații mici, activează receptorii  $R_1$ , iar în concentrații mari, receptorii  $R_a$ . Histamina, în concentrații mici activează receptorii  $H_1$  iar în concentrații mari, receptorii  $H_2$ .

Receptorii pentru insulină de la nivelul diferitelor organe sunt dimeri formați din unitățile  $\alpha$  și  $\beta$  glicozilate, atașate covalent prin legături disulfidice. Subunitatea  $\alpha$ , de 135 kD, situată extracelular, leagă hormonul, iar subunitatea  $\beta$ , de 95 kD, este ancorată în membrana plasmatică printr-un segment helix hidrofobic cu activitate tirozinkinazică. După legarea insulinei la subunitatea  $\alpha$ , are loc autofosforilarea substratului  $\beta$  și stimularea activității kinazice a unor diferite substraturi tirozinice endogene și exogene. După unii, insulina în concentrații mici s-ar lega numai la acești receptori, iar în concentrații mari s-ar lega și la receptorii pentru somatostatina.

De dată mai recentă a fost identificat receptorul pentru hormonii de sex-osteradiol- $17\beta$  și  $5\alpha$ -dihidrotetosteron- la nivelul macrofagelor, hormoni responsabili de diferențele în reactivitatea imună existentă la cele două sexe: reactivitatea imună mai intensă la femei decât la bărbați, o mai mare susceptibilitate a femeilor la bolile autoimune, un prag mai crescut al nivelului seric al imunoglobulinelor, o mai mare rezistență la infecțiile bacteriene și virale etc.

Receptorii pentru hormoni și autacoizi (hormoni care acționează numai la locul sintezei lor) sunt prezenți la nivelul diferitelor celule în număr variabil, de la câteva sute până la câteva zeci de mii, efectul lor funcțional depinzând de tipul de celulă și de natura semnalului transmis prin interacția hormon-receptor. De regulă, prezența unor receptori pentru un anumit hormon la nivelul unor celule sau țesuturi este un indiciu sigur că acel țesut este sensibil la acțiunea hormonului respectiv.

## RECEPTORI PENTRU LECTINE

Recunoașterea hidraților de carbon de către proteine este esențială în diverse procese biologice. De pildă, este bine cunoscut faptul că infecția virală poate avea loc numai în condiția în care acidul sialic este recunoscut de către proteinele particulei infectante. Proteinele care leagă zaharurile ar avea situsuri sub formă de scobituri în moleculă, la nivelul cărora s-ar fixa reziduul carbohidraților (fig. 138 A).

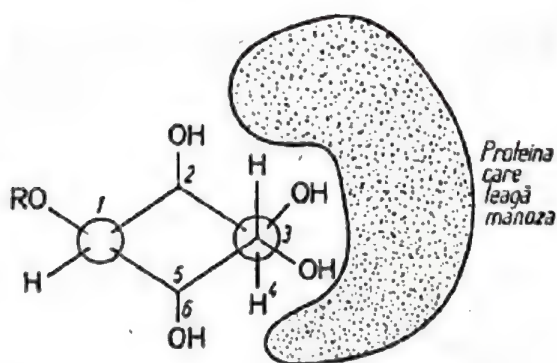


Fig.138 A. Interacția unei proteine cu un hidrat de carbon (după Y.C.Lee).

Este bine cunoscut faptul că la nivelul membranei plasmice a celulelor există hidrați de carbon diferiți, atașați la rândul lor la proteinele sau lipidele din componența acestora. La aceștia, se leagă printre altele și diferite lectine, de mare interes practic fiind cele de origine vegetală. La aceste lectine, afinitatea de legare este situată între  $10^5$ - $10^6$   $M^{-1}$ , fiind de regulă mai mare pentru oligozaharide decât pentru monozaharide. Tabelul 87 exemplifică unele lectine și hidrați de carbon care interacționează. Hidrații de carbon pot exista sub formă de complexe – glicoproteine sau lipoproteine – în diferite

modalități de asociere moleculară. De exemplu, PHA (fitohemaglutinina), un mitogen vegetal, se leagă la galactoză. Această legare poate avea loc la nivelul lanțurilor polipeptidice care conțin galactoză, cum ar fi de pildă un lanț de 20 kD care are manoză și galactoză și care este exprimat pe membrana plasmatică a limfocitelor T. În general, hidrații de carbon sunt distribuiți la nivelul diferitelor clase și subclase de limfocite T, B etc., legarea lectinelor la membrana acestora prin intermediul lor provocând aglutinarea sau multiplicarea celulei, proces biologic cunoscut și sub denumirea de "transformare blastică".

Maniera de legare a lectinelor la membrana plasmatică diferă nu numai de cea existentă în cazul antigenelor și superantigenelor, dar și de modalitățile existente în legarea diferitelor specii moleculare lectinice (fig. 138 B).

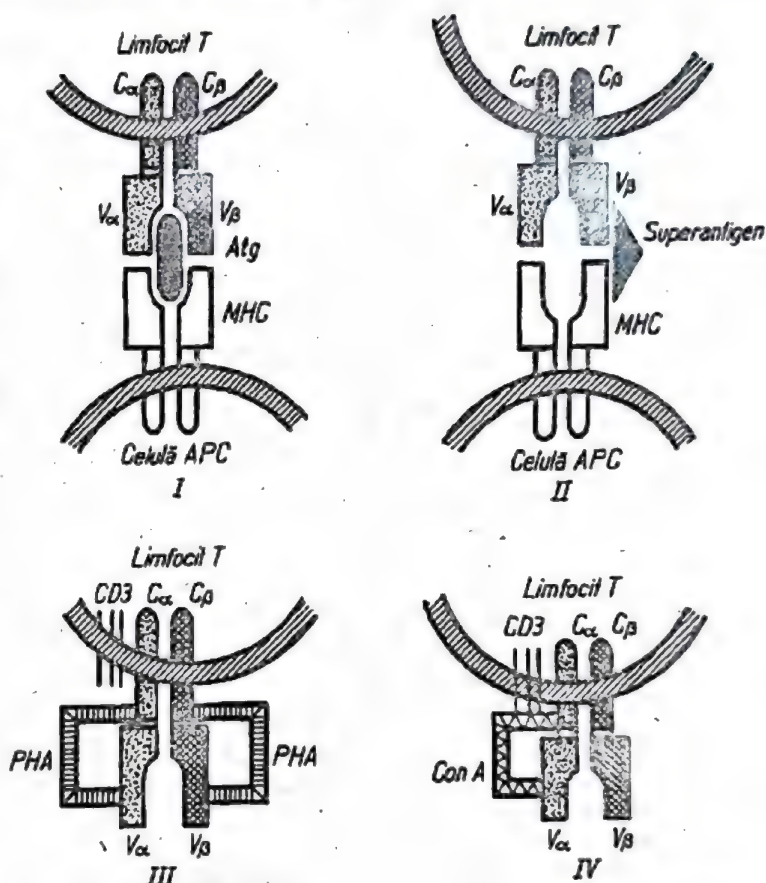
Fig. 138 B. Diferite modalități de legare a antigenelor, superantigenelor și lectinelor la membrana plasmatică a limfocitului T.

I. Antigenul este recunoscut, sub restricție MHC, de către nișa formată de domeniile variabile  $V\alpha$  și  $V\beta$  ale TCR.

II. Superantigenele se fixează numai la  $V\beta$  de către TCR și la antigenele MHC de pe APC.

III. PHA este recunoscută de către domeniile constante ( $C\alpha$ ,  $C\beta$ ) și variabile ( $V\alpha$ ,  $V\beta$ ) ale heterodimerului  $\alpha\beta$ , dar nu de  $CD_3$ .

IV. ConA este recunoscută de hidrații de carbon de la nivelul domeniilor constante și variabile ale lanțului  $\alpha$  și de  $CD_3$  (după F. Licastro și col.).



Tabelul 87

Hidrați de carbon recunoscuți de către unele lectine vegetale

Sursa lectinei	Denumirea	Simbol	Hidratul de carbon la care se leagă
<i>Canavalia ensiformis</i>	Concanavalina A	ConA	$\alpha$ - D - manoză
			$\alpha$ - D - glucoză
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phytohemagglutinin	PHA	D - galactoză NAc
<i>Lens culinaris</i>	Lentil	LCA	$\alpha$ - D - manoză
			$\alpha$ - D - glucoză
<i>Arachis hypogea</i>	Peanut agglutinin	PNA	Galactoză



Sunt două momente diferite în relația lectină-celulă: a) un moment de inducție care duce celula de la faza  $G_0$  la faza  $G_1$  și b) un moment de angajare care duce celula de la faza  $G_1$  la faza S. Pentru realizarea fazei de inducție, celula necesită un semnal de la lectină și alt semnal, accesoriu, care de regulă, în cazul limfocitelor T în special, este dat de IL-1.

De regulă, celulele și în special limfocitele T au receptori pentru diferite lectine, iar mai multe subpopulații celulare pot avea receptori pentru aceeași lectină. De pildă, limfocitele T au receptori pentru PHA, indiferent dacă sunt T activatoare, supresoare, etc. *In vitro*, în contact cu PHA se vor multiplica, celulele trecând prin faza de "blast" (fig.139), proces cunoscut sub denumirea de "activare policlonală", spre deosebire de stimularea antigenică unde este interesată numai clona care are receptori pentru antigenul respectiv și un mare număr de clone ca în cazul stimulării lectinice.



Fig.139. Limfocit T "transformat blast" (1) și normal (2). Se observă diferența de volum dintre cele două celule.

#### ALȚI RECEPTORI

Celulele au diferiți alți receptori, ca de pildă pentru TGF- $\beta$  (transforming growth factors = factori de creștere-transformare), EGR-R (factorul de creștere a epidermei), M-CSF sau GM-CSF (factorul de stimulare a cloniilor monocitare, respectiv granulocitar-monocitare), PDGF (factorul de creștere și diferențiere a trombocitelor), VIP (vasoactive intestinale peptide = peptida intestinală vaso-activă) etc.

De exemplu, pe trombocite, pe unele limfocite T, pe monocite și macrofage, există receptori pentru TGF, un homodimer care poate exista sub formă de două peptide distincte, TGF- $\alpha$  și TGF- $\beta$ , dar cu activitate biologică unică. Pe monocite și macrofage receptorul pentru TGF este slab exprimat, din care cauză susceptibilitatea acestor celule este relativ scăzută față de TGF. Acest factor provoacă agregarea trombocitelor, activează monocitele în vederea eliberării de mediatori cu rol în inflamații, stimulează proliferarea fibroblastelor, a angiogenezei etc.

M-CSF este un homodimer glicozilat cu acțiune pleiotropică asupra fagocitelor mononucleare pentru care monocitele exprimă cca. 50 000 receptori / celulă prin intermediul cărora primește semnale de la CSF-1 care le controlează proliferarea, diferențierea, viabilitatea, activitatea tumoricidă și producția de alte citokine.

Receptorul pentru PDGF se poate autofosforila, funcția lui fiind însoțită de activități protein-tirozin-kinazice cu fosforilarea fosfatidilinozitolului și activarea mecanismelor biochimice intracitoplasmaticе. Exemplele ar putea continua. Pe baza caracteristicilor structurale și a secvenței aminoacizilor, receptorii au fost încadrați în mai multe subclase (v. fig. 128). Desigur, această tentativă de "clasificare" are o valoare limitată, deoarece nici numărul lor și nici toate specificitățile de legare nu sunt cunoscute încă. Ce este cunoscut, este faptul că ei există, că sunt niște adevărate "antene", extrem de numeroase și extrem de diversificate în recepționarea mesajelor din afara celulei, demonstrând cât se poate de evident, prin simpla lor existență, complexitatea fantastică a funcțiilor celulare.



## SEMNALE ȘI MESAGERI LA NIVEL CELULAR

Activitatea metabolică a unei celule și, implicit, a aglomerărilor de celule care formează țesuturile, organele și în final organismul în toată complexitatea sa este în fond expresia relațiilor enzimă-substrat. Dacă ar fi să considerăm simplist procesele biologice care stau la baza vieții, poate că definiția cea mai apropiată de adevăr ar fi aceea că viața nu este altceva decât exprimarea în dinamică a relațiilor enzimă-substrat aflate sub influența permanentă a diverșilor factori de mediu. O celulă, este în fond un bogat arsenal de enzime localizate la toate nivelurile ei: membrană, citosol, nucleu. Acestea se influențează reciproc, se controlează, se condiționează și se autoregenerează, realizând, atunci când acționează asupra substratului, așa zisele "cascade biochimice" care încorporează sau eliberează energia necesară activității celulare, fie pentru exprimarea unor funcții ale sale, fie pentru multiplicarea ei. De exemplu, celula angajată în răspunsul imun specific realizează modificări activatoare ale unor enzime multifuncționale, care catalizează secvența de reacții ce vor controla toată activitatea celulei, începând cu sinteza acizilor grași și a lipidelor de membrană, ca de pildă acetil-coenzima A, malonil-coenzima A și diverse alte sintetaze și terminând cu metabolismul acizilor nucleici, unde sunt implicate enzime ca dezoxiribonucleaze, ribonucleaze, reverstranscriptaze, timidinkinaze, uridin-kinaze etc.

Ca durată de timp, exprimarea finală a relațiilor enzimă-substrat variază foarte mult. De exemplu, degranularea mastocitelor sau a eozinofilelor stimulate de către ligand prin receptorii  $Fc\epsilon$  se realizează într-un interval de la câteva zecimi de secundă până la 1-2 minute, interval care începe cu legarea stimulatorului la receptor și se sfârșește cu expulzarea granulelor. Stimularea granulocitelor PMN care provoacă "explozia respiratorie" urmată de generarea metaboliților de oxigen durează câteva minute, timp necesar activării NADPH-oxidazei legată la membrană în vederea reducerii oxigenului molecular ( $O_2$ ) în superoxid anion ( $O_2^-$ ). În schimb, sinteza unor molecule de proteină, ca de pildă sinteza de imunoglobuline, conversia lor de la o clasă la alta, sau multiplicarea celulară, necesită minute, ore sau chiar zile.

Dar, indiferent de durata de timp necesară manifestării biologice a fenomenelor, principiul fundamental care stă la baza regenerării lor la nivel celular este în linii mari identic:

- a) stimularea celulei de către liganzi endogeni sau exogeni;
- b) recepționarea mesajelor prin intermediul receptorilor;
- c) activarea unor enzime care, acționând asupra substratului, vor declanșa reacții metabolice în lanț, cu urmări diferite asupra economiei și funcțiilor celulelor respective.

În cazul sistemului imun, principalele celule implicate în inițierea și dezvoltarea reacțiilor imune sunt macrofagele și limfocitele care, odată stimulate, comunică



între ele, sintetizând și eliberând în acest scop citokinele, niște glicoproteine cu greutate moleculară mică (7-80 kD), dar cu largi implicații biologice și cu multe caracteristici similare hormonilor din sistemul endocrin. Pentru sinteza lor și pentru exprimarea potențialului funcțional al celulelor, sunt absolut necesare declanșarea reacțiilor metabolice și implicarea enzimelor celulare. Nu este aici locul pentru descrierea sau chiar menționarea tuturor enzimelor prezente la diferite nivele, urmând a fi menționate doar unele cu rol fundamental în declanșarea unor "relee biochimice" care să genereze activarea limfocitelor și exprimarea unor funcții ale lor. În linii mari, acestea efectuează defosforilări prin care se realizează mobilizarea și accelerarea transportului transmembranar al diferiților ioni, stimularea metabolismului fosfatidil inozitolilor (PI) etc. Fosfolipazele sunt responsabile de defosforilarea substratului, iar kinazele de fosforilarea lui. Astfel, fosforilarea-defosforilarea proteinelor catabolizate de enzime este un important mecanism de control al activității metabolice a tuturor tipurilor de celule. Toate aceste tipuri au un component ubicitar - inozitolul - prezent în celulele vii într-o mare complexitate structurală și funcțională. De exemplu, unii componenți ai lui, cum ar fi glicozil - fosfatidil - inozitolul, asigură ancorarea unor glicoproteine la membrana celulară, alții, ca inozitol-1, 4, 5, trifosfatul (IP3), acționează ca mesageri secundari intracelulari în transferul semnalelor primite la receptori etc. La rândul lor, ca orice substrat, sunt controlați de enzime sau proteine, care hidrolizează, îi deplasează de la un nivel al celulei la altul, îi recompun în structuri moleculare inițiale activării etc. De exemplu, citosolul celulelor eukariote conține proteine care mediază transportul diferitelor clase de fosfolipide, dintre care unele au specificități pentru fosfatidil-colină, altele pentru fosfatidil-serină, fosfatidil-inozitol etc. Proteina de transfer a PI este implicată în metabolismul și transferul acestuia de la nivelul membranei plasmatică în condițiile menținerii gradului de concentrație intramembranară constant. Când un ligand se leagă la receptorii de membrană, PI sunt hidrolizați, moleculele rezultate din această hidroliză (IP3 și DAG) acționând ca mesageri secundari la nivel citoplasmatic.

**Fosfolipazele** sunt enzime larg răspândite, prezente practic la toate celulele prokariote și eukariote, care catalizează hidroliza fosfolipidelor de membrană. În funcție de modul de clivare a fosfolipidelor se cunosc fosfolipidele A1, A2, B, C și D (PLA1, PLA2, PLB, PLC și PLD). Dintre toate, de interes major pentru imunologie este PLA2, larg răspândită în natură, găsindu-se din abundență în pancreas, în veninul de șarpe, spermatozoizi etc. Este componenta antigenică majoră a veninului de albine și reprezintă unul dintre cele mai bine definite antigene care joacă rol în declanșarea bolilor alergice. Acționează asupra fosfolipidelor și eliberează acidul arahidonic (AA), calea ciclooxygenazică convertind AA în tromboxan A2 (TxA2), un potent inductor al agregării trombocitelor și al contracției vasculare. PLC acționează asupra fosfolipizilor inozitolici, degradarea inozitolfosfatului 2 (IP2) de către PLC generând IP3 și DAG. La rândul său, DAG este hidrolizat în continuare de către diacilglicerollipază și monoacetil-glicerol-lipază, redevenind AA.

PLA2 cu greutatea moleculară de cca. 15 kD, are multe legături disulfidice, este foarte stabilă la pH acid și la temperaturi crescute și are mare afinitate pentru fosfolipidele agregate și conjugate. Este o enzimă asociată membranei plasmatică care catalizează hidroliza unui ester-acil legat la glicerofosfolipide, producând acizi grași liberi și lizofosfolipide. Pentru exprimarea activității sale necesită prezența  $\text{Ca}^{2+}$ . Această enzimă joacă un rol important în patogeneza pancreatitei acute, serul pacienților cu activitate crescută a PLA2 corelând cu necroza pancreatică severă. De asemenea, se găsește împreună cu PLC în cantități mari în



monocitele și macrofagele pacienților cu artrită reumatoidă, în boli cardiace, în șoc endotoxic, unde participă la instalarea colapsului circulator, în ischemia intestinală, boli nervoase, boli ale pielii cum ar fi leziunile psoriazice etc. PLA2 participă la generarea proceselor inflamatorii.

**Lipocortinele**, o familie de proteine anti-inflamatorii, printre care forma predominantă, de 35-40 kD, inhibă activitatea PLA2 prevenind formarea de mediatori ai inflamației ca prostaglandine (PG) și leucotriene (LT). Glucocorticoizii induc formarea lipocortinelor care, inhibând formarea PLA2, scad până la anulare eliberarea AA din lipidele de membrană. În serul pacienților cu artrită reumatoidă există anticorpi antilipomodulină care, blocând efectul acestei proteine din familia lipocortinelor, măresc activitatea PLA2. Totuși, proteinele din familia lipocortinelor sunt prezente în concentrație mare în multe celule, așa că nu este sigur dacă ele sunt induse de glucocorticoizi sau sunt inhibitori ai PLA2. De aici ideea că glucocorticoizii ar acționa prin alte mecanisme încă necunoscute, distincte de cele care ar consta din simpla lor legare la enzime. PLA2 mai este inhibată de vitamina E, care acționează ca un anti-oxidant al lipidelor de membrană, de uteroglobulină, o proteină sintetizată de epiteliul endometrului și celulele secretoare ale oviductului și, probabil, și de către vitamina C. Calciul ionic activează hidroliza fosfolipidelor de către PLA2 iar IL-1 și TNF îi activează potențialul enzimatic, de unde concluzia că reacțiile inflamatorii induse de IL-1 s-ar realiza prin activarea acestei enzime, mai exact prin activarea II PLA2 din zonele de inflamație și nu al PLA2 pancreatică. La nivelul limfocitelor și probabil și al altor celule, PLA2 este complexată cu lipocortina, inhibitorul ei natural. PKC, odată activată, desface complexul lipocortina - PLA2 eliberând enzima care, în prezența nivelului crescut de  $Ca^{2+}$  citosolic se activează scindând fosfolipidele de membrană în lipofosfolipide și acid arahidonic (fig. 140).

**Proteinkinazele** sunt enzime ubicuitare responsabile de fosforilarea proteinelor, proces cu largi implicații în proliferarea celulară, dereglarea fosforilării ducând adesea la transformarea neoplazică a celulei. De aceea, fosforilarea poate fi considerată ca un marker al transformării celulare. Această familie de enzime poate fosforila proteinele la nivelul tirozinei, serinei sau treoninei (tirozin-kinaza, serin-kinaza sau treonin-kinaza), rol important din acest punct de vedere avându-l PKC, care conține cel puțin 7 izoenzime diferite (tabelul 88), constituind un adevărat pivot în reglarea funcțiilor celulelor și transducerea semnalelor de la membrană spre nucleu. Activarea PKC poate induce modificări în conformația sau distribuția actinelor limfocitare. De asemenea, această enzimă este potențial funcțională atunci când este legată la lipidele anionice ale membranei ca de pildă fosfatidil-serina (PTS), cardiolipina, PIP<sub>2</sub> și acidul fosfatidic (APh) care acționează ca un receptor al ei. Este activată fiziologic de DAG generat de PI membranar și constituie principalul receptor intracelular al forbol esterilor. Enzima are un domeniu catalitic COOH terminal de 50 kD, care interacționează cu ATP și proteina substrat, și un domeniu NH<sub>2</sub> terminal de 32 kD care recepționează mesajele de la  $Ca^{2+}$ , lipide și forbol esterii.

Sfingozina, staurosporina, 1-(5-isoquinilinsulfonil)-2-metil piperazina, îi inhibă activitatea, fiind blocanți ai multiplicării celulelor, iar acizii grași nesaturați și în special acidul oleic sunt activatori care, spre deosebire de DAG și PTS nu necesită prezența  $Ca^{2+}$ . În afară de rolul ei în transducerea semnalelor și sinteza proteinelor PKC, prin fosforilarea tirozinhidrolazei, mediază efectele factorilor de creștere a neuronilor (NGF), fiind de fapt un mesager secund pentru NGF. Tot ea asigură mobilitatea spermatozoizilor. Fosforilarea tirozinelor este necesară pentru transducerea semnalelor. Dereglarea tirozinkinazelor poate influența proliferarea

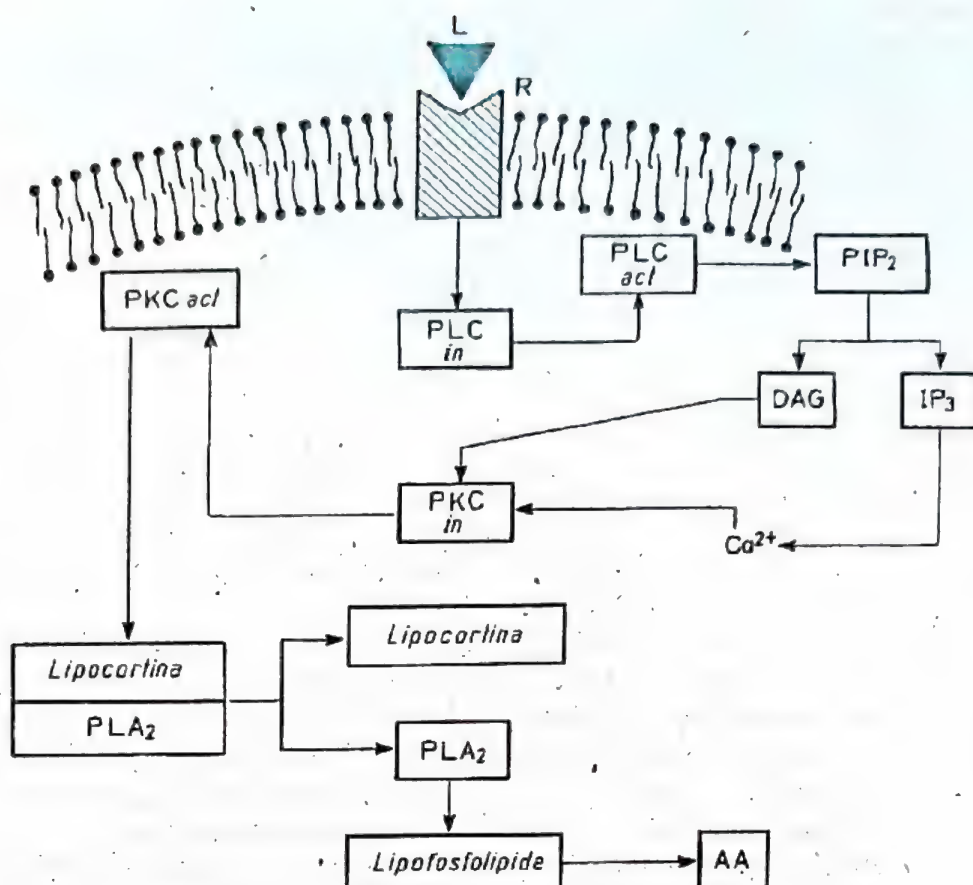


Fig.140. Relee biochimice care duc la activarea PLA<sub>2</sub> consecutiv stimulilor transmiși de la nivelul receptorilor (R) de către ligand (L) (după E. Kaiser și col.).

PLC<sub>in</sub> = fosfolipaza C inactivă; PLC<sub>act</sub> = fosfolipaza C activată; PIP<sub>2</sub> = fosfatidil-inozitol-difosfat; IP<sub>3</sub> = inozitol-trifosfat; DAG = diacil-glicerol; PKC<sub>in</sub> = protein-kinaza C inactivă; PKC<sub>act</sub> = protein-kinaza C activată; PLA<sub>2</sub> = fosfolipaza A<sub>2</sub>; AA = acidul arahidonic.

celulară, unele enzime care participă la transducerea semnalelor, ca de exemplu PLC, putând fi substrat pentru receptorii tirozin-kinazici. Deci, proteinkinazele joacă un rol fundamental în transducția semnalelor care reglează creșterea, diferențierea și răspunsul celulei la diverse semnale venite din exterior.

Tabelul 88

Subspeciile de PKC prezente în țesuturile mamiferelor (după Y. Nishizuka)

Caracteristica	Subspecia						
	$\alpha$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$	$\zeta$
Numărul reziduurilor de aminoacizi	672	671	673	697	673	737	592
Greutate moleculară (kD)	76,80	76,79	76,90	78,40	77,50	83,50	67,70
Localizare pe cromozomul uman nr.	17	16	16	18	?	?	?



**Adenilat- și guanilat-ciclazele** sunt enzime care catalizează adenin-fosfații, respectiv guanidin-fosfații implicați în multiple funcții celulare. Acești nucleotizi pot modifica concentrația intracelulară a unor ioni, ca de pildă  $\text{Ca}^{2+}$  sau  $\text{Mg}^{2+}$ , pot schimba permeabilizarea membranei plasmatică, stimula sau inhiba proliferarea celulară sau sinteza unor proteine etc. De exemplu, ATP induce modificări în fluxul  $\text{Ca}^{2+}$  și  $\text{Mg}^{2+}$  în timocite fără a fi implicată și PLC, permeabilizează membrana timocitelor, deschide porii membranari etc. ATP intracelular este o importantă sursă de energie pentru celulă, nucleotidul rămânând de regulă în interiorul acesteia. Totuși, unele celule îl pot elimina iar acesta, odată ajuns în exterior, poate influența multe procese biologice ale trombocitelor, monocitelor, mastocitelor sau limfocitelor, acționând în special prin cele două mecanisme amintite: modificarea permeabilității membranei celulare și a fluxului transmembranar de ioni. Sub acțiunea fosfatazelor și kinazelor se poate realiza ciclul ATP-ADP-cAMP cu eliberare de energie și cu impact asupra metabolismului celular. ATP-azele, de exemplu, sunt enzime celulare intrinsece care folosesc ATP ca substrat sau ca sursă de energie, fiind activate de unul sau mai mulți cationi ca de pildă  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ , și, poate, și de anioni cum ar fi  $\text{Cl}^-$ .

În multe cazuri, ATP-azele sunt mașinării moleculare care controlează transportul ionilor. Astfel, ATP și probabil și ADP induc blastogeneza timocitelor tratate cu forbol-miristat-acetat (PMA), cresc  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular fără implicarea PLC etc. Un rol important în controlul mecanismelor funcționale ale celulei revine cAMP, ale cărui efecte sunt mediate de fosforilarea proteinelor celulare de către o protein-kinază dependentă de cAMP și compusă din patru substanțe, dintre care două reglatoare (R) și două catalitice (C), care împreună formează o holoenzimă. cAMP emite semnale inhibitoare asupra unor funcții celulare. În cantități mari, inhibă de exemplu proliferarea limfocitelor expuse stimulilor mitogenici *in vitro*, probabil ca urmare a inhibiției sintezei IL-1, IL-2 și a receptorilor pentru IL-2.

Dar efectul cAMP nu este numai inhibitor; el depinde de starea de activare a celulei, motiv pentru care poate fi considerat mai mult imunomodulator decât inhibitor. De exemplu, limfocitele T h activate sintetizează IL-2, IFN- $\gamma$  și limfotoxine. În cantități mai modeste, sintetizează IL-4 și IL-5. Sinteza acestora este condiționată de gradul de activare a celulei. La stimuli puternici, care ocolesc receptorul pentru antigen de pe limfocitul T (TCR), sunt sintetizate atât IL-2 cât și IL-4 dar, o dată cu creșterea nivelului cAMP, sinteza IL-2 este blocată fără modificarea sintezei IL-4. În caz de nivel celular scăzut al cAMP, efectul este diametral opus. Efectele ATP și ale derivaților săi sunt influențate antagonist de către GTP și derivații săi, care realizează sub controlul guanidinciclazelor ciclul GTP-GDP-cGMP.

Deci, scindarea GTP sau ATP de către GTP-ază sau ATP-ază joacă un rol important în controlul energetic și biochimic al celulei, ele acționând antagonist. Astfel, GTP stimulează exocitoza granulelor mastocitelor, iar ATP o inhibă, ATP-aza fiind considerată ca o mașinărie a transportului transmembranar al  $\text{Na}^+$  și eventual și al  $\text{K}^+$ . GTP-azele au rol în controlul transmiterii semnalelor transmembranare, direcționează sinteza și translocarea proteinelor etc. Ar exista trei clase de GTP-aze: una cu greutatea moleculară de 21 kD, produsă de unele proto-oncogene, altă cu rol în sinteza unor proteine ribozomale și alta, ca subunități  $\alpha$  ale proteinelor G. Pentru a efectua multiplele funcții celulare, toate GTP-azele trec prin același ciclu unidirecțional în care hidroliza GTP și conversia GDP-GTP au un rol major. Cheia funcției celulare a GTP-azelor este modificarea afinității GTP pentru macromolecule ca de pildă lanțurile  $\alpha$  ale proteinelor G.



The diagram illustrates the signaling pathways of the AgRP receptor (AgR) embedded in a cell membrane. AgR is a heterodimer composed of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. Upon activation, it triggers two main pathways:

- PLC  $\beta$  Pathway:** AgR activates PLC  $\beta$ , which hydrolyzes PIP<sub>2</sub> into DAG (diacylglycerol) and IP<sub>3</sub> (inositol trisphosphate).
- PTK Pathway:** AgR activates PTK (tyrosine kinase), which in turn activates PLC  $\gamma$ . PLC  $\gamma$  hydrolyzes PIP<sub>2</sub> into DAG and IP<sub>3</sub>. Additionally, PTK activates PI (phosphoinositide 3-kinase), which converts PIP into PIP<sub>2</sub>.

The diagram shows the membrane as a curved structure with receptors and signaling molecules. The cytoplasmic side is on the left, and the extracellular side is on the right.

Subfamilia de proteine G are cel puțin cinci membri: Gs, Gi, Go, Gt și Gz, toți formați din subunități  $\alpha\beta\gamma$  și potenți în transducerea semnalelor pe calea receptor-proteină G-efector. Gs și Gi sunt mediatori ai stimulării sau inhibiției adenilat ciclazei, Go este o proteină abundentă în creier care reglează canalele de  $\text{Ca}^{2+}$ , Gt sau "transductina" este predominantă în retină, iar Gz necunoscută încă sub raport funcțional. Semnalele transduse de către ele ar fi implicate în activarea PLC, PLA2, unele dintre ele putând acționa ca mesageri secundari datorită efectelor lor directe asupra canalelor ionice. Această mare subfamilie, extrem de diversificată structural, implicată în reglarea evenimentelor celulare (semnalizare transmembranară, transcripție, proliferare și diferențiere), poate fi împărțită, pe baza comportării față de toxina pertussis, în două clase majore: a) molecule sensibile la toxină (Gi, Go) și b) rezistente la toxină (Gs, Gz).



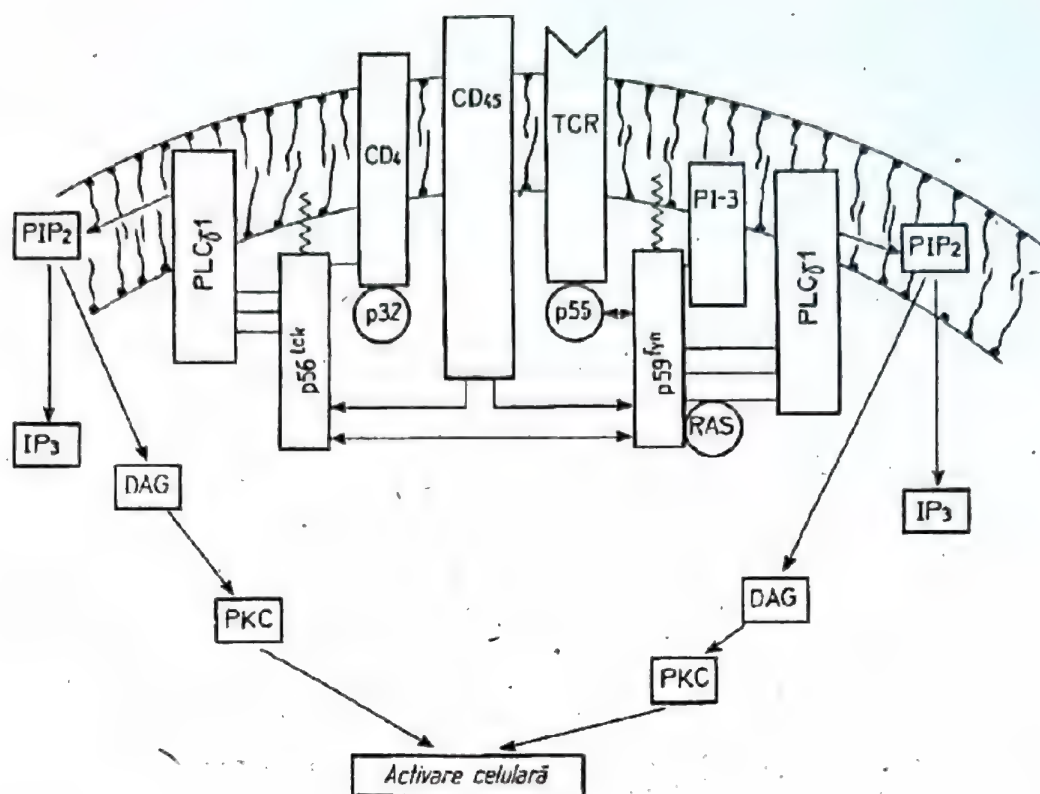


Fig.142. Evenimente activatoare la nivelul limfocitului T consecutiv angajării receptorului pentru antigen (TCR) și a altor molecule accesorii (CD4, CD45) cu implicarea proteinelor G și protein-kinazelor (după M.Harnett și K. Rigley).

Proteinele G și proteinkinazele (PKT) pot interacționa pentru reglarea semnalizării prin intermediul receptorilor pentru antigen, al proceselor biochimice de la nivelul celulelor B și T, reglând cuplarea receptorului la fosfolipaze (PLC).

Recent, a fost descoperită existența unei alte proteine - p55 - care este asociată receptorului pentru antigen de la nivelul limfocitului T și care ar media legătura dintre acesta și protein-tirozin-fosfataza p59<sup>fyn</sup>, acționând sinergic cu CD45 (fig. 142).

Procesele exacte care au loc în activarea celulară și rolul proteinelor G sunt încă insuficient cunoscute. S-a emis ipoteza că la celula în repaus receptorii sunt distanțați de proteina G, apropierea lor realizându-se numai după stimularea receptorului de către ligand. O altă ipoteză susține că receptorul și proteina G sunt "precuplați", formând un complex, care poate interacționa cu subunitatea catalitică a adenilat-ciclazei) numai după ce hormonul s-a fixat la cuplu. Și într-un caz și în celălalt, formarea complexului receptor-proteină G-efector (de exemplu, adenilat-ciclaza) este absolut necesară pentru activarea proteinelor G și transmiterea semnalelor. Aceste proteine au fost implicate, în cazul limfocitelor T, în reglarea fosfatidil-inozitolului (PI), fosfatidil-inozitol-colinei, PLC, PLD, PLA2 și altor amine, fără a se cunoaște precis dacă ele au vreun rol în activarea PKC. Nu este exclus că receptorii de membrană, după contactul cu ligandul, să activeze aceste proteine și pe alte căi, la care ar participa eventual și tubulina din citoscheletul celulei, un heterodimer cu greutatea moleculară de 110 kD.

## SEMNALE BIOCHIMICE INTRACELULARE

Orice compus chimic, care se poate fixa la receptorii de la nivelul membranei, citoplasmei sau nucleului, se numește "ligand". Liganzii pot fi molecule de proteine sau glicoproteine recunoscuți specific ca antigene de către limfocitele *T* sau *B*, molecule de enzimă, lectine, hormoni etc. În linii generale, impactul ligandului cu receptorii de la nivelul membranei plasmatică, de exemplu, este urmat de generarea unor semnale și transmiterea de informații către nucleu, efectul final fiind modificarea "status-quo"-ului celular, în sensul activării sau inhibării unor funcții ale acesteia.

Generarea acestor "mesageri secundari" provoacă activarea factorilor transcripționali cu recunoașterea următoarelor etape distincte:

- a) recepționarea mesajului la nivelul receptorului;
- b) transmiterea informațiilor la nivelul membranei și citoplasmei, care include, în cazul stimulării antigenice a limfocitelor de exemplu, hidroliza IP, activarea PKC, redistribuirea  $\text{Ca}^{2+}$  în citosol, influxul de  $\text{Ca}^{2+}$ , creșterea activității tirozin-kinaze, respectiv fosforilarea proteinelor;
- c) declanșarea evenimentelor nucleare care vor modifica starea nucleului, activând mitoza celulară sau sinteza unor proteine.

Deci, legarea la receptor este un proces inițial obligatoriu care declanșează diferite evenimente la nivel membranar, exprimate prin activarea fosforilării proteinelor și în general a funcțiilor enzimatică, modificarea transportului și a activității metabolice provocând schimbări caracteristice în organizarea citoscheletului și, implicit, în morfologia și biologia celulei. Hormonii steroizi și tiroidieni, de exemplu, traversează ușor membrana plasmatică pentru a ajunge în celulă, unde se leagă la receptori care, la rândul lor, se vor fixa la nivelul ADN-ului. Legarea hormonului la receptor activează translocarea acestuia spre nucleu, unde se leagă de elementul de control al ADN și activează transcripția genică. În cazul altor liganzi, inclusiv al hormonilor slab difuzibili, activarea transcripției genice se face indirect, prin legarea liganzilor peptidici la receptorii de pe membrană, proces care activează formarea de mesageri intracelulari secunzi de genul cAMP, DAG, IP,  $\text{Ca}^{2+}$  etc. Practic, sunt două căi mai importante de transducție a semnalului în controlul transcripției genei: a) o cale care duce la activarea PKA, dependentă de cAMP și b) o cale care duce la activarea PKC, dependentă de cGMP.

Pentru realizarea acestor etape, receptorii de membrană, indiferent de specificitatea lor pentru ligand, sunt alcătuiți din trei domenii distincte, și anume, din domeniul extracelular specializat în recunoașterea ligandului, continuat cu domeniul transmembranar, intracitoplasmatic (cu rol în transmiterea mesajelor primite de la exterior către interiorul celulei), care de regulă are o grupare COOH terminală. Acesta este cazul receptorilor pentru antigen de natură imunoglobulinică de pe suprafața limfocitelor *B*. Există însă și situații în care, pentru transmiterea mesajelor, este necesară asocierea la receptorul propriu-zis a unor molecule accesorii, cum este cazul receptorului pentru antigen de pe limfocitul *T* sau al proteinelor *G* de la nivelul altor receptori. În afara receptorului și componentelor transductoare, care pot face parte integrală din compoziția lui sau pot fi sub formă de molecule asociate, mai intervin în releele de informare și moleculele "efectoare" care transmit sau amplifică mesajul și care, de regulă, sunt enzime de genul adenilat- sau guanilat-ciclazelor, fosfolipazelor etc. La celula în stare de repaus, receptorul este inactiv iar moleculele accesorii sunt implantate în membrana celulară ca unități independente și eventual izolate unele de altele. Odată receptorul activat, se produc modificări în relația receptor-transductor-efector,



declanșându-se semnalul activator. Probabil există diferite mecanisme și căi de transmitere a semnalului care intră în funcție condiționat de tipul de receptor care generează diferite transformări la nivel celular, ca de pildă modificarea microviscozității membranei, activarea enzimelor responsabile de procesele de fosforilare sau defosforilare, modificarea și accelerarea transportului transmembranar al ionilor, stimularea metabolismului PI, reorganizarea citoscheletului etc.

Stimularea și activarea funcțiilor celulare se poate face pe două direcții majore de recepționare și transmitere a semnalelor: a) prin fosforilarea tirozin-kinazei și b) prin hidroliza inozitol-fosfaților. Prima cale joacă un rol important în acțiunea unor factori de creștere cum ar fi factorul de creștere a epitelilor (EGF), factorul de creștere derivat din trombocite (PDGF) etc., iar cea de a doua este implicată în mitoză celulară și depinde de activarea PLC care va hidroliza IP<sub>2</sub> și va stimula PKC ca urmare a mobilizării Ca<sup>2+</sup>. În cazul limfocitelor B, de exemplu, legarea încrucișată a receptorilor de membrană de natură imunoglobulinică (mlg) de către antigene sau anticorpi este primul act generator al cascadelor biochimice intracelulare. Dar, pentru ca celula să poată evolua spre plasmocit și spre mitoză, este necesară și intervenția unor citokine și chiar contacte intercelulare T - B. Astfel, după legarea mlg au loc în câteva sute de secunde fosforilarea reziduurilor de serină și treonină din substratul membranei, activarea PLC prin legarea GTP și hidroliza inozitolilor cu formarea de IP<sub>3</sub> care mediază eliberarea de Ca<sup>2+</sup> din reticulul endoplasmatic și formarea de DAG. După cca. 60 de secunde de la stimularea receptorilor, IP<sub>3</sub> atinge nivelul intracelular maxim pentru ca ulterior, prin defosforilări secvențiale, să fie convertit în IP<sub>2</sub>, IP<sub>1</sub> și IP. În decurs de 1-2 minute de la stimul, DAG mediază translocarea PKC din citosol către membrană, proces care însoțește activarea acestei enzime și la care participă atât Ca<sup>2+</sup> cât și fosfatidil-serina (PTS). Mulți activatori ai PKC sunt și promotori potențiali ai devierilor neoplazice, de unde ideea că activarea acestei enzime poate fi și un factor de inițiere și progresie a proliferării tumorale. Eliberarea Ca<sup>2+</sup> intracelular este urmată de un influx de Ca<sup>2+</sup> din exteriorul celulei, internalizare la care DAG și forbol-esterii nu dețin rol important, acesta revenind inozitol-fosfatului 4 (IP<sub>4</sub>). Protein-kinaza C, după ce a activat sinteza proteinelor, este inhibată funcțional prin translocarea de la nivelul membranei către nucleu, proces indus de cAMP, IFN-γ și TGF-γ. Aceleași secvențe biochimice au loc și la nivelul limfocitului T : activarea de către antigen sau lectine, care constituie semnalul I, este asociată cu mobilizarea intracelulară a rezervelor de Ca<sup>2+</sup> și apoi de deplasarea transmembranară a ionilor, evenimentul cel mai timpuriu începând cu efluxul de K<sup>+</sup> și H<sup>+</sup>, activarea Ca<sup>2+</sup> de la nivelul reticulului endoplasmatic și apoi a influxului de Ca<sup>2+</sup> și Na<sup>+</sup>. Transducerea semnalului activează rapid hidroliza IP<sub>2</sub> în IP<sub>3</sub>, responsabil cu mobilizarea Ca<sup>2+</sup> și activarea PKC. Scăderea nivelului Ca<sup>2+</sup> intracelular activează prin IP<sub>3</sub> calea de acces a Ca<sup>2+</sup> extracelular, astfel că se realizează menținerea la nivel constant a concentrației intracelulare a ionilor de Ca în condițiile existenței unei active circulații intra- și extracelulare. Ca și în cazul limfocitelor B, limfocitele T nu progresează spre ciclul mitotic decât după intervenția semnalului II generat de IL-1 sau de derivații acil ai forbolului. Ambele semnale induc sinteza IL-2 și exprimarea receptorilor pentru IL-2 la nivelul membranei plasmatică (fig. 143). Transformarea blastică a limfocitelor este însoțită de modificări în compoziția lipidelor, ca de pildă creșterea proporției de acid oleic și scăderea celei de acid linoleic urmate de modificarea proprietăților fizice ale membranei, asociate cu modularea proteinelor ei. Desigur, releele biochimice sunt mult mai complexe deoarece ele implică nu numai intervenția altor ioni, ca de pildă Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> etc., dar și declanșarea mecanismelor de autoreglare



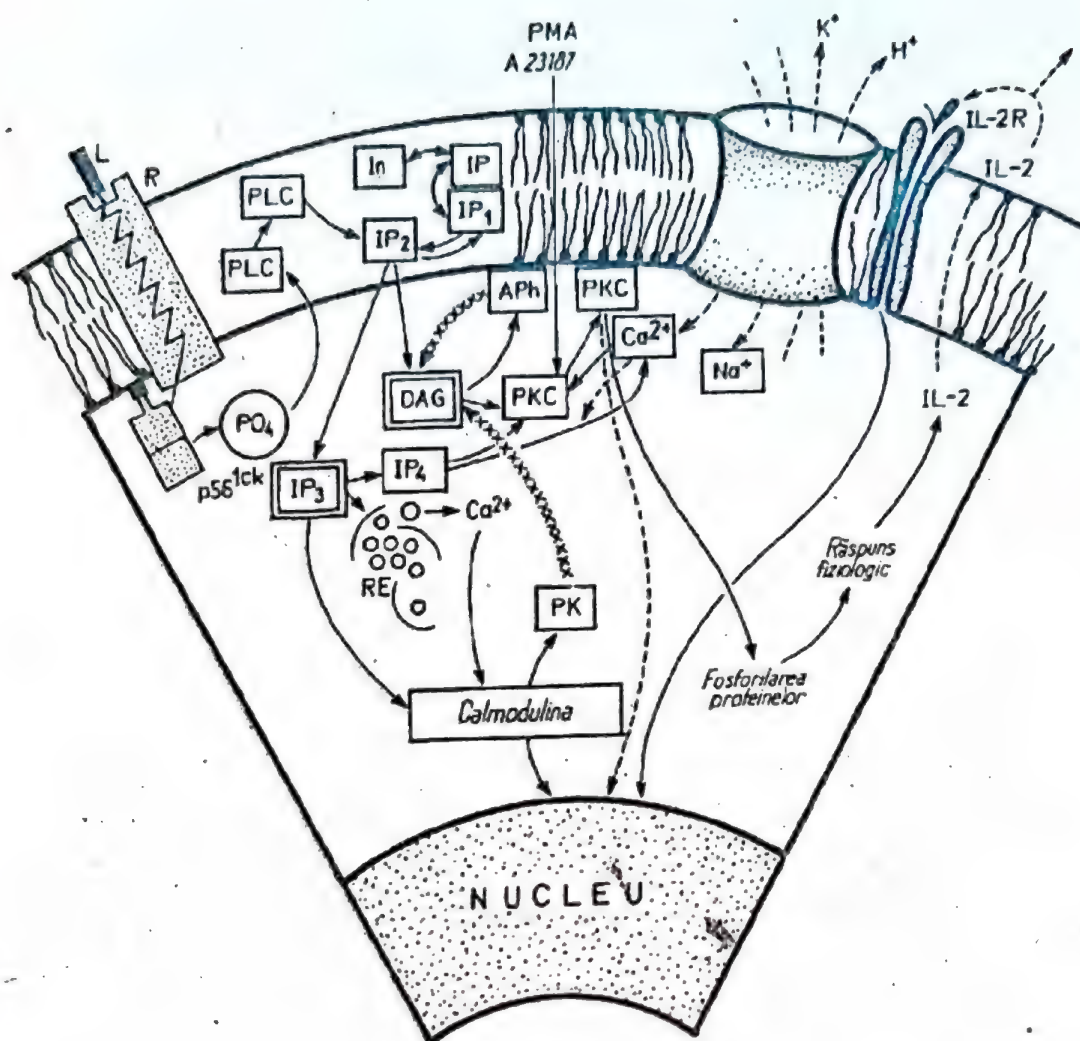


Fig.143. Căi metabolice de activare a celulei consecutiv hidrolizei inozitol-fosfaților. Fixarea ligandului (L) la receptor (R) activează transmiterea semnalelor de fosforilare ( $PO_4$ ) care vor activa fosolipaza C (PLC) și o vor transmuta de la periferia membranei către interiorul ei. PLC hidrolizează inozitol-difosfatul (din cadrul ciclului inozitol-monofosfat-IP<sub>1</sub>, inozitolfosfat și inozitol) în inozitoltrifosfat (IP<sub>3</sub>) și diacilglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> mobilizează  $Ca^{2+}$  din reticulul endoplasmic (RE) care migrează în citosol, iar DAG mobilizează proteinkinaza C (PKC) către suprafața citoplasmatică a membranei celulare, mobilizare la care contribuie și influxul de  $Ca^{2+}$  extracelular, al cărui acces în celulă este activat de către inozitol tetrafosfat (IP<sub>4</sub>).

PKC fosforilează proteinele implicate în procesele biologice celulare, cum ar fi cele cu rol în sinteza IL-2 sau în exprimarea IL-2R. O parte din DAG se disociază în acid fosfatidic (Aph), care blochează DAG nedisociat, întrerupând astfel efectul său activator asupra PKC.

Blocarea DAG se realizează și prin activarea altor proteinkinaze (PK), sub acțiunea calmodulinei, a cărei sinteză este controlată și de către IP<sub>3</sub> și care poate exercita efecte multiple asupra nucleului celulei. Una dintre primele modificări care au loc la nivelul membranei celulare după formarea complexului ligand-receptor este deschiderea canalelor pentru ioni și asigurarea afluxului și influxului acestora.

Procese similare pot fi induse și de către unli activatori de genul forbol-miristat-acetat (PMA) sau ionoforului A23187 care acționează direct asupra PKC ocolind metabolismul inozitolilor.

- transformare sau activare;
- - - - - transmutație;
- x-x-x-x-x- inhibiție.



și autocontrol cu activarea sau inhibarea reacțiilor care vor antrena alte enzime și metaboliți celulari. De exemplu, activarea PLA2 prin semnale primite de la unii hormoni modifică arhitectura dublului strat lipidic. Urmează sinteza acidului arahidonic din care, pe cale ciclo-oxigenazică se sintetizează prostaglandine stimulatorie ale adenilat-ciclazei care controlează sinteza cAMP. La rândul său, cAMP va inhiba proliferarea limfocitelor și exprimarea, în cazul limfocitelor T, a receptorului E (CD2), blocând astfel receptorul pentru antigen al acestora și posibilitatea de recepționare a altor mesaje din exterior.

Pe scurt, în linii generale, ar fi următoarele căi posibile de transmitere a semnalelor activatoare sau inhibitoare:

- a) Activarea enzimelor responsabile de procese de fosforilare (kinaze) sau defosforilare (fosfolipaze);
- b) Mobilizarea  $\text{Ca}^{2+}$  intra- și extracelular;
- c) Modificări în organizarea citoscheletului;
- d) Schimbări la nivelul nucleotizilor ciclici.

**Activarea enzimelor** implică tirozinkinazele și fosfolipazele, în special cu translocări de la nivelul citoplasmei către membrană (în caz de activare funcțională), sau de la nivelul membranei către nucleu (în caz de inhibiție). Translocările pot fi declanșate de stimuli antigenici sau mitogenici primiți prin receptorii de membrană sau de forbol-esteri care vor declanșa hidroliza inozitol-fosfaților, cu consecințele ilustrate anterior. Un mare număr de receptori induc alterări conformaționale și modificări funcționale ale adenilat-ciclazei (ACy), o altă enzimă cu rol major în modularea funcțiilor celulare. În cazul ei, forbol-esterii cresc, scad sau nu au nici un efect asupra potențialului său funcțional, fapt care permite speculația că modularea ACy poate juca un rol important în reglarea proliferării limfocitelor. Astfel PGE<sub>2</sub> activează ACy care, la rândul ei, va modula răspunsul celular prin intermediul metaboliților ciclului acidului arahidonic (AA) și al nucleotizilor ciclici. Creșterea pragului intracelular al cAMP și scăderea nivelului oGMP ar putea avea efecte inhibitoare, în timp ce scăderea cAMP și creșterea oGMP ar activa unele funcții celulare. De exemplu, PGE<sub>2</sub> inhibă sinteza IL-2 responsabilă, atunci când se găsește în concentrații optime, de translocare spre membrana plasmatică și de fosforilarea substraturilor membranare. Prin modularea adenilatciclazei, PGE<sub>2</sub> stimulează hidroliza ATP și formarea cAMP cu efect inhibitor asupra proliferării limfocitare. Adenilat-ciclaza nu este însă modulată numai de PGE<sub>2</sub> sau IL-2. Se pare că activitatea ei ar fi controlată și de alte complexe proteice, ca de pildă TPA (12-0-tetradecanoil-forbol-B-acetat) care ar acționa într-o manieră similară IL-2, adică prin stimularea PKC, ajungându-se la inhibiția ACy datorită fosforilării reversibile a unor componente ale acesteia.

Din punct de vedere funcțional există posibilitatea intervenției a două clase distincte de receptori: una care induce transformări la nivelul inozitolilor, urmate de mobilizarea  $\text{Ca}^{2+}$ , de activarea translocării PKC, de sinteza de limfokine și de exprimarea de receptori pentru acestea, și alta, care stimulează PLA realizând, prin derivații AA, respectiv prin PGE<sub>2</sub>, activarea ACy și creșterea nivelului cAMP cu efect inhibitor asupra unor funcții celulare. Desigur, aceste căi metabolice sunt departe de a fi unice iar procesele menționate mai sus nu sunt chiar atât de simple. Intervin o mulțime de factori, dintre care unii probabil că sunt încă necunoscuți. De exemplu, pe lângă proteinkinaze, adenilat-ciclaze, fosfolipaze etc., un rol important în activarea funcțiilor celulare consecutiv interacțiilor receptor-ligand ar reveni transglutaminazei, o enzimă situată intracelular și care este activată numai în condiția creșterii pragului de  $\text{Ca}^{2+}$ , creștere care, după cum s-a subliniat, are loc în urma stimulării celulei consecutiv legării încrucișate a



receptorilor și activării inozitol-fosfaților. Activitatea transglutaminazei crește foarte mult în primele 10-30 de minute de la stimularea limfocitelor *T* cu activatori policlonali de genul PHA sau ConA în prezența ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$ . Probabil că declanșarea rapidă a influxului de  $\text{Ca}^{2+}$  imediat după stimularea limfocitelor este impusă și de necesitatea de activare a acestei enzime care, odată activată, se va lega la complexul receptor-ligand prin lanțuri  $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{-lizină}$ , facilitând endocitoza complexului și declanșarea reacțiilor biochimice intracelulare.

**Mobilizarea  $\text{Ca}^{2+}$ .** Creșterea intracelulară a  $\text{Ca}^{2+}$  activează nu numai transglutaminaza dar și alte enzime citoplasmice cu rol în sinteza proteinelor și în mitoza celulară. Se pare că modificările de la nivelul fosfatidil-inozitolilor, instalate imediat după primirea semnalelor de la complexul ligand-receptor, constituie impulsul primar major care declanșează deschiderea canalelor și cascada de reacții biochimice intracelulare. Deschiderea acestora permite atât accesul ionilor din afară în interiorul celulei, cu condiția ca în exterior concentrația lor să nu fie mai mică de  $3 \times 10^{-6}$  M, cât și efluxul unor ioni din celulă în afara ei. Viteza de deschidere a canalelor și durata de captare a  $\text{Ca}^{2+}$  sunt condiționate atât de specie cât și de tipul celulei implicate. Astfel, limfocitele umane își mențin deschise canalele timp de cca. 20-24 de ore de la stimularea *in vitro* cu PHA, pe când cele murine, le mențin deschise cca. un minut. Această perioadă de timp corespunde perioadelor în care este necesară prezența unui prag crescut de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Probabil că, datorită acestui fenomen, momentul maxim al încorporării de timidină tritiată ( $^3\text{H-Td}$ ) și deci al sintezei de ADN de către limfocitele *T* umane stimulate cu PHA este de 72 de ore iar al celor murine, de numai 36 de ore. În cazul stimulării cu ConA, captarea de  $\text{Ca}^{2+}$  de către limfocitele umane atinge nivelul maxim în decurs de 1-2 ore. Pe lângă influxul de  $\text{Ca}^{2+}$ , are loc și influxul de  $\text{Na}^+$ , concomitent cu efluxul de  $\text{K}^+$  și  $\text{H}^+$ . Spre deosebire de lectine, care mobilizează  $\text{Ca}^{2+}$  și provoacă afluxul acestuia în celulă, IL-2 nu induce astfel de modificări. La nivelul neutrofilelor, stimulul recepționat la suprafața membranei este urmat de dislocarea  $\text{Ca}^{2+}$  din depozitul membrănar către citosol și deschiderea canalelor care, în final, activează diverse enzime și induc profunde modificări la nivelul actinelor și implicit ale citoscheletului și formei celulei.

**Modificări la nivelul citoscheletului.** Mobilizarea ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$ , ca urmare a semnalelor primite de la complexul ligand-receptor, provoacă schimbări în distribuția actinelor și alterări în organizarea sistemului microfilamental.

**Modularea metabolică a nucleotizilor ciclici.** La majoritatea celulelor activate, un rol important revine "ciclazelor" din grupa adenil- sau guanil-ciclazei care controlează metabolismul nucleotizilor ciclici (cAMP sau cGMP), adevărați mesageri secundari ai răspunsului celular. Recepționarea informației despre ligand și transmiterea ei de la suprafața membranei către nucleu implică și activarea sintezei unuia sau altuia dintre acești nucleotizi care se realizează condiționat de natura biochimică a receptorului, structura ligandului, microviscozitatea membranei celulare în momentul stimulului etc.

**Relee biochimice de semnalizare și activare celulară.** De regulă, imediat după recunoașterea ligandului de către receptori și legarea încrucișată a acestora, sunt activați diferiți factori enzimatici de la nivelul membranei citoplasmice sau chiar al nucleului care, după cum menționam anterior, pot fosforila sau defosforila proteinele. Se pare că există cel puțin două clase de receptori prin care se realizează transducerea semnalelor membranare. O clasă depinde de hidroliza fosfatidil-inozitolului-4,5-difosfat ( $\text{PIP}_2$ ) care generează  $\text{IP}_3$  și DAG, iar alta de generarea cAMP ca mesager secund.



În figura 144 sunt prezentate schematic două astfel de situații diferite rezultate ca urmare a stimulării a două tipuri de receptori de acest gen de la nivelul membranei limfocitului T. În primul caz, imediat după recunoașterea ligandului, informația este transmisă prin intermediul proteinei G la enzima guanilat-ciclază care controlează hidroliza GTP și mobilizarea PLC de la nivelul citoplasmei înspre membrană. Ajunsă la acest nivel, PLC fosforilează PIP2 situat la granița dintre membrană și citoplasmă din care va rezulta IP3, un agent extrem de potent și selectiv pentru eliberarea  $\text{Ca}^{2+}$  din reticulul endoplasmic și DAG, stimulator al PKC. Prin defosforilări, IP3 poate reveni la PIP2 și IP, ciclul continuând spre inozitol care, prin refosforilări, evoluează spre PI, PIP1 și PIP2.

În această fază,  $\text{K}^+$  părăsește celula iar GTP este defosforilat sub acțiunea GTP-azei în GDP și cGMP care, în prezența PKC, transmite semnale activatoare către nucleu. Inozitolul fosfat-3 mobilizează  $\text{Ca}^{2+}$  din reticulul endoplasmic situat submembranar, cu care se asociază, stimulând atât deplasarea dinspre citoplasmă către membrană a proteinkinazelor, cât și activitatea acestora. Împreună cu DAG favorizează influxul  $\text{Ca}^{2+}$  și  $\text{Na}^+$  extracelular și efluxul de  $\text{H}^+$  cu modificarea pH-ului citoplasmei. La rândul ei, PKC activează sinteza IL-2, exprimarea receptorilor pentru IL-2 la nivelul membranei celulare și depozitarea acesteia. Recunoașterea IL-2 de către receptori va amplifica semnalele către nucleu, stimulând blastogeneza. În cazul stimulării receptorilor pentru autacoizi, ca de pildă diverși hormoni, se formează o triadă funcțională la care participă receptorul, proteinele G care transduc semnalele de la receptor și enzima adenilat-ciclază. Interacțiunea dintre ligand și adenilat-ciclază declanșează hidroliza ATP și formarea de cAMP. Proteinele G transmit semnalul de la receptor la adenilat-ciclază reglând nivelul cAMP prin stimularea sau inhibiția funcțională a acestei enzime. Receptorii intracitoplasmatici pentru cAMP sunt proteinkinazele A, două izoenzyme denumite I și II, cu proprietăți fizico-chimice diferite. În celula în repaus, PKA-I este localizată în citoplasmă iar PKA-II submembranar. Adenozin-mono-fosfatul ciclic formează un complex cu PKA-I și PKA-II care se leagă la ADN alterând atât transcrierea cât și evenimentele post-transcripționale de la nivelul limfocitelor. Ca atare, cAMP mediază semnalele inhibitoare, antiproliferative pentru celulă. Efectul inhibitor generat de către ligand se poate realiza "indirect" prin stimularea PLA2 membranară, activarea metabolismului acidului arahidonic și sinteza prostaglandinelor pe cale ciclooxigenazică. Acidul arahidonic și derivații săi metabolici (eicosanoizii) acționează ca mesageri intracelulari și intercelulari. Precursorii acestui acid sunt acizii grași încorporați în lipidele de membrană, schimbările în conținutul acidului ducând la modificări în sinteza eicosanoizilor (prostaglandine, leucotriene) ca o consecință a hidrolizei lipidelor datorită activării PLC și PLA2 de către receptor. PGE1 și PGE2 au o acțiune blocantă asupra unor funcții celulare, legarea lor la receptori generând semnale activatoare pentru adenilat-ciclaze. PGA, PGF1 și PGF2 nu au astfel de efecte. Pe lângă activarea sintezei cAMP și generarea semnalelor inhibitoare prin intermediul acestui grup de nucleotizi, o altă modalitate prin care prostaglandinele își pot exercita efectul lor inhibitor este blocarea sintezei IL-2.

*Activarea limfocitelor T stimulate prin TCR* se supune, în linii generale, aceluiași reguli. La aceste celule, heterodimerul  $\alpha\beta$  este asociat cu lanțurile  $\gamma\delta\epsilon$  ale CD3 și cu subunitățile  $\zeta$  care transmit semnalele necesare activării genelor IL-2. După stimularea receptorului, primul eveniment care are loc este fosforilarea tirozinelor unui mare număr de proteine care includ lanțurile  $\zeta$  ale TCR, PLC- $\gamma$ 1 și CD5. Activarea PLC de către protein-tirozin-kinaze (PTK) induce hidroliza PIP2, formarea de DAG și IP3, mobilizarea  $\text{Ca}^{2+}$ , toate acestea țintind activarea altor substanțe



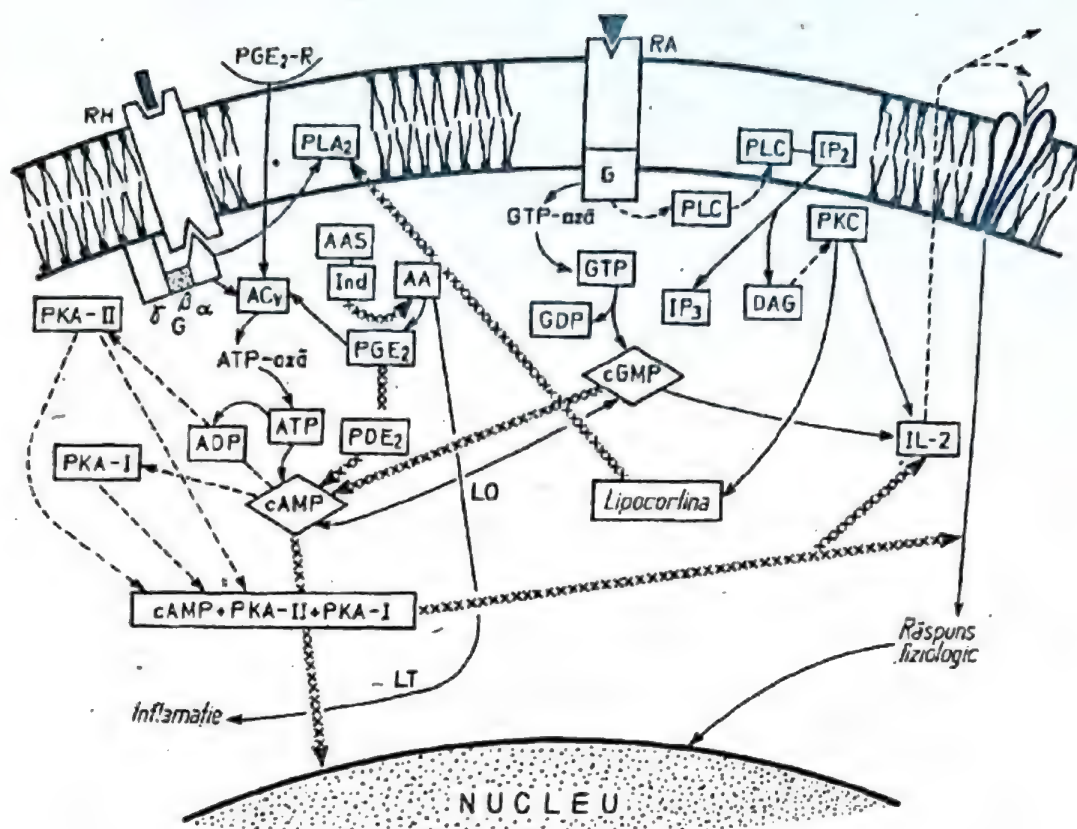


Fig.144. Reprezentarea schematică a unor modalități de reglare și interferență ale căilor biochimice intracelulare.

Stimularea celulei prin receptorul pentru antigen (RA) antrenează hidroliza inozitolilor și mobilizarea ionilor cu efecte activatoare asupra proliferării celulare sau asupra funcțiilor ei de sinteză. Stimularea este posibilă și prin alți receptori (RH = receptorul pentru hormoni, PGE<sub>2</sub>-R = receptorul pentru prostaglandina E<sub>2</sub>). Stimulul va modifica arhitectura dublului strat lipidic, generând formarea de acid arahidonic (AA) și a metaboliților acestuia. Derivații AA pot evolua pe cale lipooxygenazică (LO) sau ciclooxigenazică (CO), cu formarea de leucotriene (LT) cu rol în procesele inflamatorii sau de prostaglandine (PGE<sub>2</sub>) și adenosin-monofosfat ciclic (cAMP). Intracelular, prostaglandinele activează adenilat-ciclaza (ACy), care controlează, prin activarea adenosin-trifosfatazei (ATP-aza), sinteza cAMP. ACy poate fi activată și de către prostaglandinele existente în afara celulei, care se pot fixa la receptorii lor de la nivelul membranei plasmatic (PGE<sub>2</sub>-R). cAMP poate mobiliza proteinkinazele A1 și A2 (PKA-I, PKA-AII) formând complexe inhibitoare pentru funcțiile celulei, ca de pildă sinteza IL-2, sinteza de anticorpi, proliferarea celulei, exprimarea CD2, activitatea citotoxică etc. El se menține într-o relație de echilibru funcțional cu cGMP, influențându-se reciproc.

O altă cale de control implică intervenția fosfodiesterazei E<sub>2</sub> (PDE<sub>2</sub>), care inhibă formarea cAMP atunci când acesta scapă de sub efectul inhibitor al PGE<sub>2</sub>.

Lipocortina inhibă PLA<sub>2</sub> fiind un antagonist al fosfolipazei și al formării de prostaglandine. Indometacinul sunt inhibitori ai prostaglandinsintetazei și ai formării de prostaglandine.

AA = acid arahidonic; AAS = acidul acetilsalicilic; ACy = adenilat-ciclaza; ADP = adenosin-difosfat; ATP = adenosin-trifosfat; ATP-aza adenosin-trifosfatază; cAMP = adenosin-monofosfat ciclic; DAG = diacilglicerol; GDP = guanidin-difosfat; GTP = guanidin-trifosfat; GTP-aza = guanidin-fosfatază; cGMP = guanidin-monofosfat ciclic; IL-2 = interleukina 2; IL-2 R = receptor pentru IL-2; Ind = indometacin; G = proteina G ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ); PLC = fosfolipaza C; PKC = protein-kinaze; PLA<sub>2</sub> = fosfolipaza A<sub>2</sub>; PGE<sub>2</sub>-R = receptor pentru prostaglandina E<sub>2</sub>; PKA-I sau PKA-II = proteinkinaza A1 sau A-2;

→ semnale activatoare; - - - -> transmutație; xxx - inhibiție.



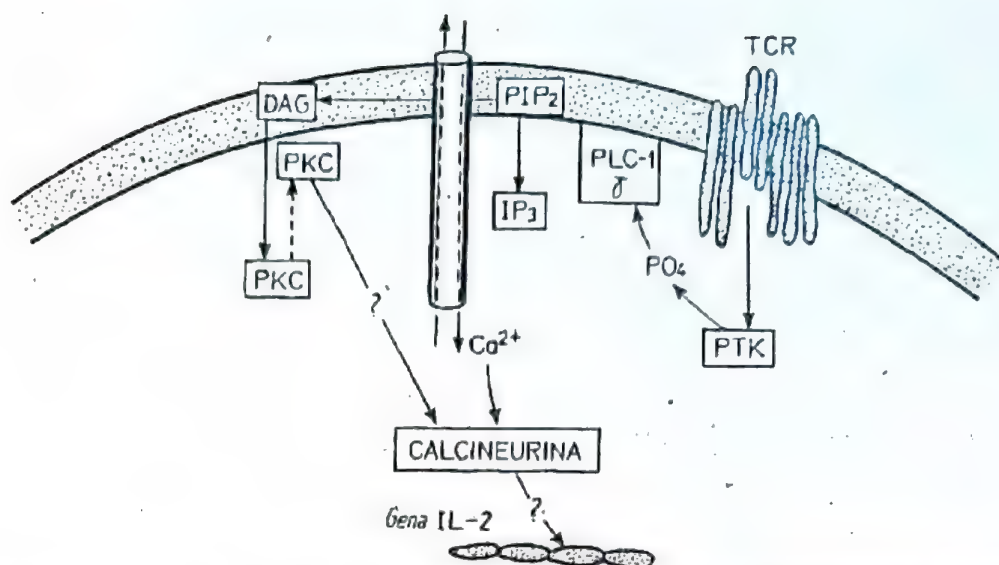


Fig.145. Evenimentele de transducere a semnalelor care au loc după stimularea receptorului pentru antigen (TCR) de la nivelul limfocitului T (după J.D. Fraser și col.).

înainte de nucleu (fig. 145). Creșterea concentrației intracitoplasmatică a  $Ca^{2+}$  duce la activarea enzimelor reglate de calmodulină cu implicarea calcineurinei (dependentă de calmodulină), activarea genei IL-2 și a unor complexe de "factori nucleari" ca NK-kB, AP-1, AP-3, NF-AT etc. Ca urmare a acestor evenimente, are loc, în câteva minute, transcrierea unor gene cu rol în proliferarea celulei T, și anume c-myc, c-fos, c-jun. Efectul semnalelor primite de la TCR este amplificat de alte semnale transmise de moleculele de adeziune (CD2, LFA-1, CD28, CD44) cu rol reglator critic pentru sinteza limfokinelor.

În reglarea cuplării antigenului cu TCR și a transmiterii intracelulare a semnalelor, intervine și proteina CD45 care are afiliată la extremitatea intracitoplasmatică o fosfotirozin-fosfatază (PTP-ază), cu rol de semnal coactivator în transmiterea mesajelor (fig. 146). Prin activitatea sa tirozin-fosfatazică, CD45

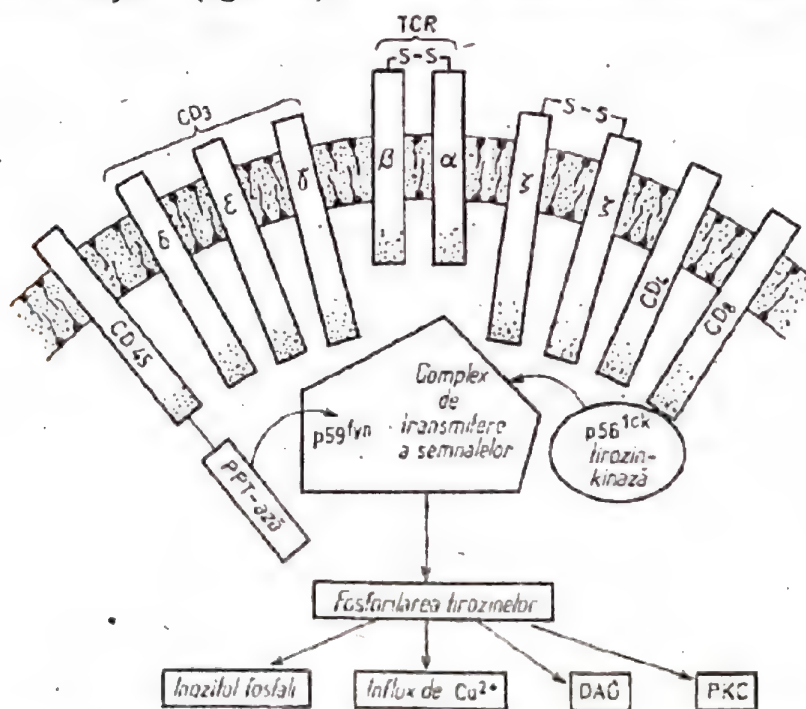


Fig.146. Implicarea CD45 în activarea limfocitelor T (după D. Alexander și col.).

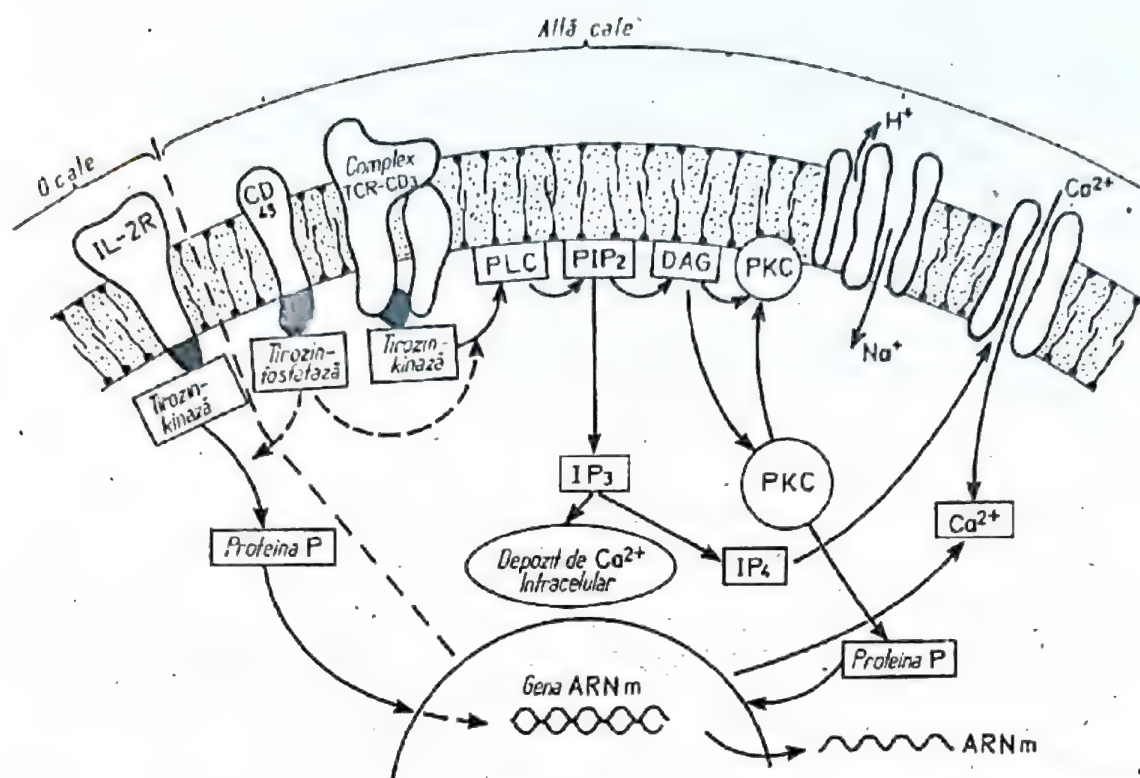


Fig.147. Legarea antigenului la complexul TCR-CD3 este urmată de activarea PLC prin activitatea tirozinkinazică (TRK) a acestuia. Legarea IL-2 la receptorul ei (IL-2R), prin activitatea tirozinkinazică, poate "ocoli" calea de activare prin TCR-CD3. CD45 poate regla aceste căi de semnalizare prin activitatea sa tirozinfosfatazică (TRP) (după S. Damjanovich și col.).

poate regla calea de semnalizare venită atât de la IL-2R cât și de la complexul TCR-CD3 (fig. 147).

În sfârșit, legarea unor citokine la receptorii lor poate influența activarea limfocitelor T. De pildă, IL-1, IL-6 activează sinteza IL-2, pe când IL-10 o inhibă.

Este în afară de orice discuție faptul că procesele biochimice care constituie "relee" de transmitere a informației la și de la suprafața celulei sunt mult mai complexe, exemplele de mai sus reprezentând doar o imagine estompată a acestei complexități. Descifrarea în continuare a acestor mecanisme care au loc la nivel molecular și celular va permite o mai bună înțelegere și stăpânire a unor procese intime ale vieții care îmbracă aspecte "normale" sau "patologice".



## DETERMINISMUL GENETIC AL FUNCȚIILOR IMUNE

Sinteza proteinelor, indiferent dacă se găsesc sub formă de molecule libere sau de compuși celulari, este controlată genetic. Genele de la nivelul ADN-ului celular ordonă modul de înșiruire a aminoacizilor în lanțul polipeptidic primar, iar ARN-ul execută acest ordin la nivel ribozomal. Modul de înșiruire a aminoacizilor în lanțul primar va condiționa "buclarea" acestuia în forme secundare, terțiare și cuaternare ale moleculei, locul, clasa și cantitatea de glucide asociate moleculei respective, proprietățile antigenice și în final, funcțiile sale biologice. Este suficient ca un singur aminoacid să fie translocat din poziția lui normală, pentru ca întreaga moleculă să fie modificată sub raport antigenic.

Situația este asemănătoare celei realizate prin adiția, deleția sau "translocarea" unei litere în șirul de litere care formează un cuvânt: uneori o unică modificare schimbă total semnificația mesajului transmis prin cuvântul respectiv. De pildă, conform simbolurilor actuale care definesc aminoacizii esențiali prin literele alfabetului latin, alanina este notată cu A, cysteina cu C și arginina cu R. Deci, tripeptidul Cys-Al-Arg poate fi notat CAR, care are o semnificație biochimică bine definită. Dar să considerăm numai semnificația lingvistică a acestor simboluri: este aceea de "car", adică de vehicul tractat de animale. Prin adiția unui alt simbol, vom putea obține ACAR sau CARA, deci un substantiv și un adjectiv "înruit" cu un cuvânt italian (cara = dragă), adică două noțiuni complet distincte între ele. Același efect se obține și prin translocarea unui singur aminoacid sau, în exemplificarea lingvistică dată, a unei singure litere: CAR = ARC = RAC, trei substantive diferite, deci cuvinte cu sensuri total diferite obținute prin o simplă schimbare de poziție a unei litere în cadrul unui șir de litere. Efectele similare realizează și deleția: ACAR = A + CAR.

Deci, respectarea strictă a ordinii literelor, aceste simboluri pentru sunet în șirul de litere ale unui cuvânt, menține nealterată semnificația mesajului transmis, modificarea poziției, chiar minoră, putând schimba total sensul mesajului.

Exact aceeași situație este și în structura proteinelor, orice modificare de poziție în lanțul primar putând schimba profund funcțiile moleculei. Controlul genetic asigură conservarea ordinii de înșiruire a aminoacizilor și, deci, realizarea unor molecule cu proprietăți antigenice și cu funcții bine definite, care pot fi proprii tuturor indivizilor unei specii sau numai unor grupe de indivizi care aparțin aceleiași specii, sau chiar unui singur individ. De pildă, dacă un iepure este inoculat cu albumină umană, sistemul lui imun va recunoaște moleculele de albumină ca străine datorită conformației lor sterice particulare și le va elimina imun, prin sinteza de anticorpi care vor recunoaște specific ca străine toate moleculele de imunoglobulină sau albumină provenite de la oricare membru al speciei umane. Dacă, însă, aceste molecule sunt recoltate de la un om (donator)



și inoculate altui om (receptor sau "gazdă"), ele vor fi acceptate ca proprii și nu vor stimula sistemul imun al gazdei, de unde concluzia că structura moleculei de albumină este identică la toți membrii speciei respective. Dacă se grefează o porțiune de piele de la un om la alt om, receptorul o va elimina imun recunoscând-o ca străină și va păstra, ca și în cazul iepurelui inoculat cu albumină, memoria imunologică a primului contact, la o nouă grefare cu pielea aceluiași donator rejectarea făcându-se mult mai rapid, adică în maniera răspunsului imun secundar. Așadar, moleculele de albumină au o configurație structurală caracteristică speciei, adică este aceeași la toți oamenii, iar cele care intră în componența pielii sunt caracteristice unui singur individ din totalitatea indivizilor care alcătuiesc specia respectivă din care cauză, atunci când sunt grefate unui alt receptor, sunt recunoscute ca străine și eliminate imun.

Este evident faptul că gradul de diversificare, de "particularizare" a antigenității moleculei este diferit: mai mare la țesuturi și mai mic la moleculele de imunoglobulină sau albumină, deoarece primele se deosebesc din acest punct de vedere de la individ la individ, iar celelalte doar de la specie la specie sau de la un grup de indivizi la alt grup de indivizi. De aici concluzia că sinteza lor este controlată de grupe de gene diferite, situate pe cromozomi diferiți și la nivele diferite (local) în cadrul aceluiași cromozom.

În ce privește sistemul imun, sunt bine cunoscute genele care controlează sinteza: a) antigenelor exprimate pe suprafața celulelor, responsabile de rejectia grefelor de țesuturi sau organe; b) moleculelor de imunoglobulină, libere sau atașate la membrana limfocitelor B cu rol de receptor pentru antigen și c) receptorilor pentru antigen de pe suprafața limfocitelor T.

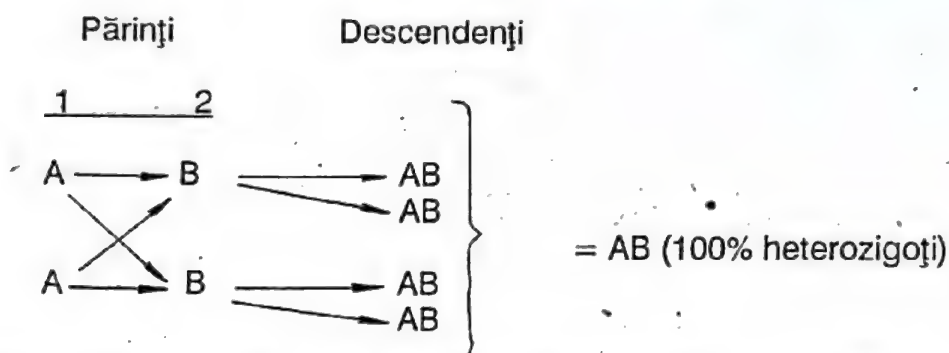
## COMPLEXUL MAJOR DE HISTOCOMPATIBILITATE (MHC = MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX)

La începutul acestui secol, K. LANDSTEINER descoperea sistemul ABO sau "grupele sangvine", semnalând diferențieri și apropieri antigenice la nivel eritrocitar și seric între diferiți subiecți. Aproape în același timp, erau în plină desfășurare cercetările legate de transplantarea tumorilor spontane sau induse experimental, cu care ocazie s-a observat că o tumoră, invadantă și nocivă pentru animalul la care a apărut spontan, este recunoscută ca străină atunci când este transplantată la un alt animal și eliminată imun. De aici concluzia că tumorile au "antigene tumorale" care pot stimula funcțiile imune ale gazdei. Ulterior însă, datele experimentale demonstau fără echivoc că nu era vorba de antigene "specifice tumorale", responsabile de rejectie fiind de fapt antigenele țesuturilor normale; orice țesut normal prelevat de la un șoarece este rejectat atunci când este grefat altui șoarece. Un fragment de piele (grefon) provenit de la unul din părinți, de pildă de la un șoarece din tulpina A, grefat la descendenții F<sub>1</sub> rezultați din încrucișarea șoarecilor A cu cei din tulpina B, este acceptat. Dacă, însă, grefonul de piele a fost recoltat de la descendenții F<sub>1</sub> și grefat la părinții A sau B, grefa nu este acceptată, fiind rejectată. S-a intuit astfel că rejectia tumorilor și țesuturilor normale este un fenomen imun care se bazează pe legile lui Mendel ale disjuncției caracterelor, fiind posibilă calcularea numărului de gene care controlează sinteza diferitelor molecule implicate în stimularea organismului gazdă. Hibrizii F<sub>1</sub> obținuți din părinții A ori B sunt AB, așa că recunosc ca proprii atât caracterele A cât și pe cele B, motiv pentru care nu elimină grefoanele provenite de la A sau de la B. Dacă însă

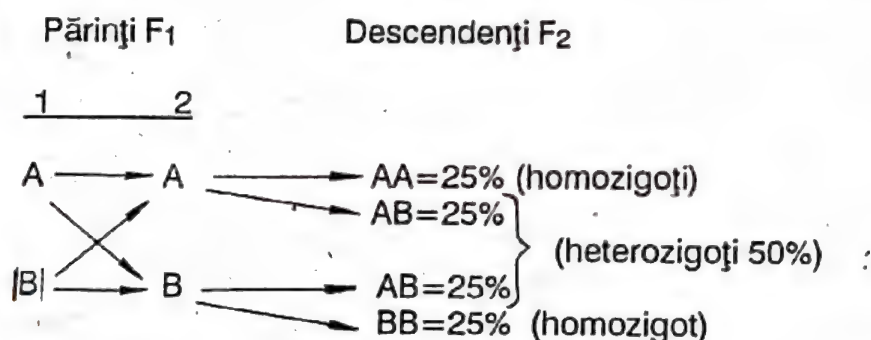


un șoarece din tulpina A este grefat cu piele provenită de la descendentul  $F_1$ , atunci, pe lângă caracterul antigenic A, va veni în contact și cu caracterul B transmis de celălalt părinte pe care-l va elimina ca străin. Rejecția nu are loc decât atunci când membrii unei populații nu sunt identici între ei din punct de vedere al antigenelor de histocompatibilitate. Identitatea poate fi realizată în trei moduri diferite, și anume: a) la gemenii univitelini născuți din același ovul; b) la hibrizii  $F_1$ , și c) la tulpinile consangvine de șoareci, împerecheați frate cu soră ( $F_xS$ ) timp de cel puțin 20 de generații.

Hibrizii  $F_1$ , prin segregarea mendeliană a caracterelor, moștenesc genele de histocompatibilitate de la ambii părinți, fiind din acest punct de vedere acceptori de grefă în proporție de 100% conform următoarei relații:



Dacă parentalii diferă la un singur locus, cum este cazul hibrizilor  $F_1$ , atunci 3/4 din descendenții  $F_2$  vor accepta grefa.



Un părinte AB va accepta grefonul de la toți hibrizii descendenți pentru că recunosc ca propriu atât caracterul A cât și pe cel B, dar  $F_2$  AA va accepta numai grefe de la homozigotii AA, respingând pe cele parentale sau de la restul de 75% descendenți  $F_2$ AB sau BB. Deci, în cazul diferenței la un singur locus de histocompatibilitate, 25% din descendenți sunt omogeni pentru caracterul A, 25% omogeni pentru caracterul B, 75% (adică 3/4) vor accepta grefa cu caracterul A sau cu caracterul B (25% A + 50% AB, respectiv 25% B + 50% AB), iar 25% o vor respinge. Dacă deosebirea este la doi loci, grefa este acceptată de  $(3/4)^2$ , adică de 9/16 respectiv 56,24%, la 3 loci de  $(3/4)^3$ , la 4 loci de  $(3/4)^4$  etc., respectiv 27/64%, (42,18%), 87/256 adică de 33,98% etc. Cu cât numărul locilor deosebiiți este mai mare, cu atât procentul șanselor de acceptare a grefei este mai mic.

Pe baza acestui gen de experimente, în anul 1914 C. C. LITTLE a emis "teoria genetică a tumorilor". În anul 1936, Peter GORER identifică la șoareci un antigen de grup sangvin pe care l-a denumit "antigenul II", iar un an mai târziu stabilește relația existentă între acest antigen și grefa de țesut tumoral. El este primul care consideră că rejecția de grefă este un fenomen imun datorat "incompatibilității dintre antigenul II al donatorului și țesuturile receptorului".



G.D.SNELL în 1946 obține liniile consangvine de șoareci. LITTLE și SNELL formulează "legile de transplantare", denumite de către unii "legile lui Little" iar de către alții "legile lui Snell", care postulează următoarele:

1. Transplantul de țesut între membrii unei tulpini înbred (consangvine) sunt acceptate în totalitate;
2. Transplantul de țesut prelevat de la un donator aparținând unei tulpini înbred, la o gazdă aparținând altei tulpini înbred, este respins imun;
3. Transplantul de la o tulpină parentală la descendenții  $F_1$  este acceptat, dar de la  $F_1$  la parental este rejectat;
4. Cea mai mare parte din  $F_2$  (75%) acceptă grea de la congenerii lor, dar o mică parte (25%) o resping.

În anul 1948, P.GORER și G.P.SNELL botează locusul care codifică pentru antigenul II "histocompatibilitate II" sau H-2, care se dovedește a fi un complex de gene care ocupă mai mulți loci pe un segment al cromozomului 17, cu rol capital în rejecția țesuturilor de transplantare, complex pe care l-au denumit "complexul major de histocompatibilitate" sau MHC (Major Histocompatibility Complex).

Toate acestea au permis formularea concluziei că atât rejecția grefelor tumorale cât și cea a țesuturilor normale reprezintă un fenomen controlat genetic, acest control fiind efectuat de mai multe gene dominante care codifică sinteza unor proteine exprimate pe membrana celulară. Aceste proteine diferă de la o tulpină de șoareci la alta și sunt responsabile de generarea reacțiilor imune atunci când ajung într-un organism care le recunoaște ca non-proprie. Genele care codifică sinteza lor au fost denumite "gene de histocompatibilitate" sau H, iar proteinele a căror sinteză este controlată de ele, "antigene de histocompatibilitate" sau "antigene MHC." S-a observat că incompatibilitatea între diferite țesuturi variază, în sensul că, în cazul unor deosebiri H, gazda elimină grea primară violent și rapid, iar în alte cazuri, eliminarea este mai mult sau mai puțin încetinită. De exemplu, grea de piele prelevată de la unii șoareci și transplantată la șoarecii aparținând unor tulpini este eliminată în 12-16 zile, iar cei care aparțin altor tulpini elimină aceeași grea în 100 de zile sau chiar mai mult. Așa a fost identificată existența a două categorii de gene organizate în adevărate "aglomerări", un fel de "complexe genice: una care controlează sinteza unor antigene "puternice", responsabile de rejecția accelerată, și alta care controlează sinteza unor antigene mai slabe, mai apropiate structural de cele ale gazdei, care vor declanșa reacții imune moderate și tardive. Prima categorie este încadrată într-un "complex major de histocompatibilitate" sau MHC, termenul de "major" definind viteza rejecției grefei, iar cea de a doua, în "complexe minore de histocompatibilitate".

La toate speciile, există un singur MHC și mai multe "complexe minore" situate pe diferiți cromozomi, care controlează sinteza unor proteine cu o structură serică mai mult sau mai puțin diferită de cele ale gazdei care a recepționat grea, de unde și durata de eliminare mai lungă sau mai scurtă a acestora. Cu alte cuvinte, cu cât numărul de loci detectați este mai mare (loci deosebiți între ei), cu atât și intensitatea rejecției va fi mai mare, și invers. Antigenele MHC majore sunt rapid rejectate pentru că exprimă un mare număr de determinanți antigenici diferiți de cei existenți în țesuturile gazdei, iar cele minore mai lent, pentru că sunt mai apropiate de cele ale gazdei. Și în cazul țesutului tumoral situația este oarecum similară, în sensul că o tumoră a pielii, de exemplu, este mai lent rejectată în comparație cu pielea normală deoarece, în cazul malignizării, pielea exprimă mai puțini determinanți antigenici decât pielea normală. În prima etapă identificarea deosebirilor genetice între diferiți subiecți se poate realiza prin grefe de organ sau de piele, procedeu frecvent folosit experimental în special la șoarece, sau prin metode serologice.



Determinarea serologică se face imunizând animalele unei tulpini consangvine (A) cu limfocite provenite de la animalele altei tulpini consangvine (B). În serul A vor apărea anticorpi anti-B, care în prezența complementului vor liza celulele pe suprafața cărora se găsesc antigenele B. Dacă serul anti-B mai reacționează și cu limfocitele tulpinilor C, D sau E, înseamnă că toate aceste tulpini (B, C, D, E) au cel puțin un determinant antigenic comun (1), care însă nu există la A. Prin absorbția selectivă se pot preciza numărul specificităților antigenice și distribuirea lor în diverse populații. Astfel, în cazul în care serul anti-B absorbit cu C mai reacționează cu limfocitele de la B, D și E, dar nu și cu cele de la A, se poate trage concluzia că celulele C au cel puțin o specificitate antigenică, adică specificitatea antigenică sau determinantul antigenic 1. La celelalte tulpini, pe lângă specificitatea 1, există și alte specificități. După absorbția cu limfocite de la D, serul mai reacționează cu B și E, dar nu cu C și A. Deci, serul D are cel puțin două specificități, una comună cu C, respectiv specificitatea 1, și alta specifică pentru D, specificitatea 2.

Absorbit cu E, serul mai reacționează cu limfocitele tulpinii B, dar cu nici una dintre celelalte tulpini cercetate, de unde concluzia că B are cel puțin patru specificități (1, 2, 3, 4), dintre care una este prezentă numai la celulele liniei B (specificitatea 4). Această specificitate antigenică proprie indivizilor unei linii consangvine, deci care nu se găsește la alte tulpini, se numește "antigen particular" sau "antigen privat", iar determinanții antigenici comuni mai multor linii de animale, responsabili de reactivitatea încrucișată, se numesc "antigene publice" (tabelul 89).

Tabelul 89

Determinarea specificităților antigenice prin absorbția încrucișată a antiserurilor

Absorbția serului imun cu celule de la animale	Specificitatea	Reacția serului cu celule de la animale			
		B	C	D	E
A	0	+	+	+	+
B	1, 2, 3, 4	-	-	-	-
C	1	+	-	+	+
D	1, 2	+	-	-	+
E	1, 2, 3	+	-	-	-

- ; + = reacție negativă sau pozitivă (lipsa sau prezența efectului citotoxic al serului după absorbție cu diferite limfocite)

La om nu se pot obține "tulpini consangvine", așa că se folosesc seruri imune provenite de la "imunizări naturale" (politransfuzări, femele multipare fertilizate de diverși masculi etc.). În afară de această metodă serologică de citotoxicitate, în prezență de complement, se mai folosește și metoda "reacției mixte limfocitare" (MLR = mixed lymphocyte reaction) care constă din incubarea *in vitro* a limfocitelor T în prezența de limfocite B cu alte antigene MHC. În cazul în care, pe suprafața limfocitelor B există determinanți antigenici controlați de MHC care nu sunt exprimați și pe celulele T, aceștia vor stimula limfocitele T care vor prolifera.

În ultimii ani, studiile de genetică privind HLA au folosit ca metode serologice leucoaglutinarea, limfocitotoxicitatea dependentă de complement și mai târziu testul ELISA (enzyme-linked immunoassay) în care, în loc de aloantiseriuri obținute de la multipare sau de la politransfuzări, se folosesc anticorpi monoclonali cu specificități de recunoaștere bine definite.

Complexele MHC conțin un mare număr de gene ale căror poziții și denumiri diferă de la specie la specie, cele mai bine cunoscute fiind cele din componența H-2 și HLA (tabelul 90).

Semnificația biologică a MHC nu se limitează numai la imunitatea de transplantare a țesuturilor normale sau tumorale, ci și la asocierea cu diferite boli. Genele acestui complex sunt implicate în restricția răspunsului imun, în prezentarea antigenului, de către celulele antigen prezentatoare (APC) limfocitelor Th, în cooperarea limfocitelor T cu celulele B și implicit în stimularea producției de anticorpi, în limfoliza mediată celular etc. De asemenea, moleculele de clasa I ar forma o parte integrantă a receptorilor pentru hormoni interacționând cu unii dintre aceștia ca, de pildă, cu insulina, cu factorul de creștere a epidermului (EGF), etc.

Tabelul 90

**Denumirea complexelor majore de histocompatibilitate la diferite specii**

Specia	Simbol	Semnificația simbolului
Șoarece	H - 2	Histocompatibility - 2
Om	HLA	Human leukocyte antigen
Porc	SLA (sau PLA)	Swine (pig) leukocyte antigen
Cobai	GPLA	Guinea - pig leukocyte antigen
Iepure	RLA	Rabbit leukocyte antigen
Câine	DLA	Dog lymphocyte antigen
Cimpanzeu	ChLA	Cimpanzee leukocyte antigen
Șobolan	RT1	Rat transplantation 1
Bou	BoLA	Bovine leukocyte antigen
Oaie	OLA	Ovine leukocyte antigen

Din punct de vedere istoric, acumularea cunoștințelor privind rolul antigenelor de histocompatibilitate a fost realizată în mai multe etape:

a. Identificarea, prin grefe de țesut normal sau tumoral, sau prin teste serologice, a existenței complexului MHC;

b. Descoperirea genelor care controlează răspunsul imun, numite IR ("immune response" sau de răspuns imun) care s-au dovedit a face parte integrantă din complexul MHC;

c. Demonstrarea faptului că răspunsul imun al limfocitelor T se face numai sub "restricție MHC", adică numai în condițiile controlului funcției de recunoaștere a antigenului de către limfocitele T;

d. Definirea, prin metode cristalografice, a structurii antigenelor MHC.

În prezent, se încearcă stabilirea unei eventuale corespondențe existente între MHC și unele boli.

### ANTIGENELE MHC

Orice celulă exprimă pe suprafața sa molecule cu proprietăți antigenice particulare, a căror sinteză este sub controlul genelor din MHC. Aceste molecule sunt foarte polimorfe și înalt antigenice, aparținând la trei clase distincte - I, II și III - cu proprietăți antigenice și alcătuire moleculară diferită.



**Moleculele aparținând clasei I** sunt glicoproteine oligomerice cu un lanț polipeptidic  $\alpha$  de 43-45 kD și unul polipeptidic neglicozilat de 12 kD, care de fapt este  $\beta_2$  - microglobulină ( $\beta_2$ -m) legată covalent de lanțul  $\alpha$ , a cărui sinteză este controlată de gene situate pe alt cromozom. Genele care codifică pentru antigenele MHC de clasa I aparțin la două categorii: una, care codifică pentru lanțul  $\alpha$  situată la nivelul locilor K și D (la șoarece) sau B, C, A (la om), alcătuită din gene foarte polimorfe și ubicuitare, și alta, care codifică pentru lanțul  $\alpha$  al moleculelor Qa și T1, mai puțin polimorfe și cu funcții insuficient cunoscute. La om există 8 exoni care codifică pentru antigenele MHC de clasa I, după cum urmează: exonul 1 care nu este "tradus", exonii 2, 3 și 4 care codifică pentru domeniile  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  și  $\alpha_3$ , exonul 5 pentru segmentul transmembrantar și exonii 6, 7 și 8, pentru segmentul intracitoplasmatic. Antigenele de clasa I sunt proteine integrate în membrana celulară, exprimate în număr de cca.  $1 \times 10^4$  -  $2 \times 10^6$  molecule pe suprafața celulelor nucleate. Sunt prezente pe suprafața tuturor celulelor cu excepția eritrocitelor. Au o distribuție slabă la nivelul spermatozoizilor, hepatocitelor, neuronilor, glandelor endocrine, placentei, mușchilor netezi și striati, precum și la nivelul limfocitelor  $CD4^+$  de la pacienții infectați cu HIV. Eritrocitele exprimă între 500 și 2 000 de molecule/celulă iar limfocitele T și B, cca.  $1 \times 10^5$  molecule. Aceste molecule pot fi eliberate în circulație de către limfocitele T și B stimulate cu activatori policlonali. Lanțul  $\alpha$ , de tip imunoglobulinic, are trei domenii extracelulare denumite  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  și  $\alpha_3$  cu cca. 283 reziduuri de aminoacizi. Domeniul  $\alpha_1$  este alcătuit din cca. 90 de reziduuri de aminoacizi, cu legături disulfidice intralanț. Domeniile  $\alpha_2$  și  $\alpha_3$  au în componența lor aproximativ același număr de aminoacizi, cu legături disulfidice intralanț. Ca și în cazul moleculelor de imunoglobulină, variabilitatea în secvența aminoacizilor este cu atât mai mare cu cât poziția acestora este mai apropiată de extremitatea  $NH_2$  terminală. Ca atare, domeniul  $\alpha_3$  este cel mai constant și mai apropiat antigenic de moleculele de clasa I ale speciei respective. Domeniile  $\alpha_1$  și  $\alpha_2$  conțin situsuri de recunoaștere pentru anticorpi și pentru celulele T. Fiecare lanț  $\alpha$  este ancorat la celulă printr-o piesă transmembrantară care conține cca. 23 reziduuri de aminoacizi hidrofobi și prin alta intracitoplasmatică,  $COOH$  terminală, cu 25 - 32 reziduuri hidrofile. La domeniul  $\alpha_3$  al lanțului și ceva mai puțin la domeniul  $\alpha_2$ , este atașat necovalent lanțul  $\beta_2$ -microglobulină, a cărui sinteză nu este controlată de către genele care intră în componența MHC, ci de către gene situate pe alți cromozomi (la om, cromozomul 15). Lanțul  $\beta_2$ -microglobulină există și ca moleculă liberă în ser și în urină, având o structură similară domeniului constant al imunoglobulinelor. Prezența lui la nivelul moleculei de clasa I conferă stabilitate spațială și posibilitatea de exprimare a lanțului greu  $\alpha$ . Imediat după sinteza sa, lanțul greu  $\alpha$  este ancorat în membrana reticulului endoplasmatic unde în decurs de câteva minute se asociază cu  $\beta_2$ -microglobulina care joacă un rol important în transportul său intracelular. După glicozilarea N-terminală, moleculele de clasa I sunt exprimate în 30 - 45 de minute pe suprafața celulei. De aceea celulele care nu pot sintetiza  $\beta_2$ -microglobulina, ca de pildă linia Daudi deși posedă lanțurile  $\alpha$  în interiorul citoplasmei, nu exprimă moleculele de clasa I pe suprafața lor. Interferonul  $\gamma$  reglează asamblarea lanțurilor  $\alpha$  și  $\beta_2$ -microglobulinei, în special în unele celule tumorale cu deficit de exprimare a antigenelor de clasa I MHC. În celulele tratate cu  $IFN-\gamma$  crește nivelul ARN mesager care controlează și transmite mesajele privitoare la transcripția sintezei acestor molecule. Efecte similare are și  $TNF-\alpha$ , deosebindu-se de majoritatea virusurilor care inhibă exprimarea lor.

Structura generală a moleculei de clasa I MHC este bine conservată în evoluția filogenetică, fiind similară la toate speciile de mamifere, în ciuda enormei variabilități a secvenței reziduurilor de aminoacizi care realizează particularități anti-



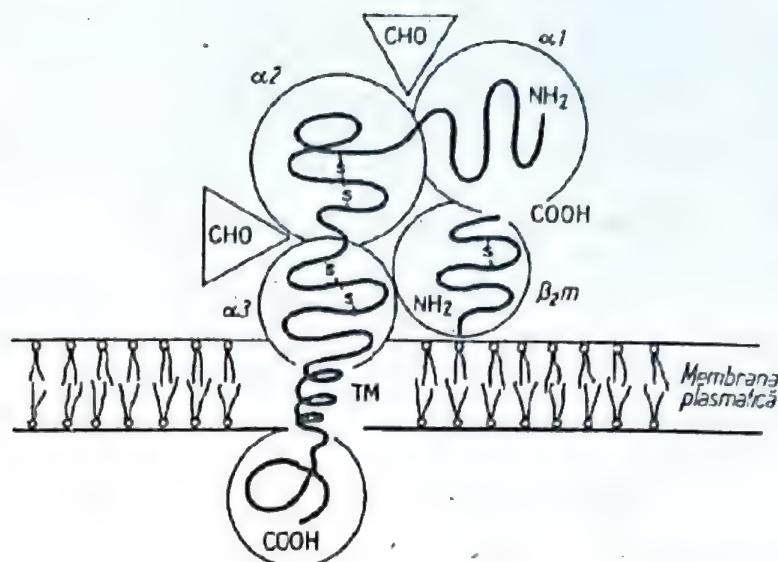


Fig.148. Antigenul MHC de clasa I. Molecula este formată dintr-un lanț lung ( $\alpha$ ) cu trei domenii extracelulare ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ), unul transmembranar (TM) și unul citoplasmatic cu extremitatea COOH terminală. În dreptul domeniilor  $\alpha 2$  și  $\alpha 3$  este atașat un lanț scurt,  $\beta 2$ -microglobulina ( $\beta 2$ -m). La primele două domenii sunt atașate hidrații de carbon (CHO) (după R.J. Duquesnoy și M. Trucco).

genice caracteristice până la nivel de individ (fig. 148). Expriarea acestor antigene pe suprafața celulelor este modulată de către diverși stimuli fiziologici (stimuli alogenici, mitogenici,  $\text{IFN-}\gamma$  etc). Moleculele de clasa I poartă un mare număr de determinanți alogenici, descriși ca antigene publice sau private, care se găsesc în special la nivelul domeniilor  $\alpha 1$  și  $\alpha 2$ . Pozițiile în care există cea mai mare lipsă de asemănare între diverși indivizi sunt cele dinspre extremitatea  $\text{NH}_2$  terminală; la nivelul reziduurilor 1 - 90 ale domeniului  $\alpha 1$  și la pozițiile 91 - 182 ale domeniului  $\alpha 2$ . Reziduurile 183 - 273 ale domeniului  $\alpha 3$  sunt ceva mai constante. Dar, cea mai mare variabilitate a aminoacizilor este la nivelul a 8 poziții, dintre care trei la nivelul domeniului  $\alpha 1$  (pozițiile 9 - 12, 40 - 45 și 62 - 80), trei în  $\alpha 2$  (94 - 97, 105 - 116 și 137 - 163), una la joncțiunea dintre  $\alpha 2$  și  $\alpha 3$  (pozițiile 173 - 194) și una la nivelul domeniului  $\alpha 3$  (pozițiile 239 - 245). Pe suprafața celulelor, sunt atașate prin ancorări fosfolipidice sau integrate total în membrana celulară și unele molecule asemănătoare celor de clasa I, asociate cu  $\beta 2$ -microglobulina, dar cu domeniile externe  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  și  $\alpha 3$  codificate de către exoni separați. Mai bine cunoscute sunt antigenele Qa, Qb, Tla și Hmt.

**Moleculele Qa** sunt polipeptide de clasa I asociate cu  $\beta 2$ -microglobulina, cu greutatea moleculară de cca 40 kD, a căror sinteză este controlată de către un set de 10 gene (Qa-1 până la Qa-10). Polimorfismul lor este controlat doar de presori selectivi și ca atare este mai puțin manifest. Unele dintre aceste molecule sunt exprimate exclusiv la nivelul unui organ, iar altele la nivelul altui organ. De exemplu, Qa-2 ar fi exprimate numai pe celulele hematopoietice, iar Qa-10 numai pe hepatocite. Deoarece determinanții Qa sunt exprimați pe celule în diferite faze evolutive, prezența lor poate servi ca marker al dezvoltării acestora. Astfel, 5 - 6% dintre timocitele  $\text{CD3}^+$  exprimă Qa-2 la intensități diferite: unele, denumite Qa-2<sup>high</sup> (Qa-2<sup>h</sup>) exprimă cca  $6 \times 10^4$  molecule/celulă, iar altele doar  $6 \times 10^3$  molecule/celulă (Qa-2<sup>low</sup>, sau Qa-2<sup>l</sup>). Nici unele nici altele nu exprimă aceste molecule mai devreme de trei săptămâni de viață. Limfocitele B exprimă de 10 ori mai puține Qa decât limfocitele T.

Poliptidele Qa-7 și Qa-9 sunt atașate la membrana splenocitelor printr-o ancoră fosfolipidică și, ca și alte molecule fosfolipidice, ca de pildă fosfatidil-inozitolii, participă *in vitro* la activarea celulelor T. Moleculele Qa-2, sensibile la PLC,



sunt exprimate de precursorii  $CD4^+/CD8^+$ , iar cele rezistente pe  $CD4^-/CD8^+$ . În timpul activării celulelor T, schimbările în proprietățile structurale ale Qa-2 sunt însoțite de scăderea exprimării lor pe suprafața celulei.

: Moleculele QB-1 (Q4) sunt glicoproteine de 47- kD asociate cu  $\beta_2$ -microglobulina. Pot fi detectate în lizatele splenice cu ajutorul anticorpilor anti- $\beta_2$ -microglobulină.

Moleculele Tla (Thymus Leukaemia Antigen) sunt exprimate pe celulele leucemice, pe timocitele normale imature și pe celulele Langerhans. Se cunosc 7 specificități serologice diferite care definesc 6 haplotipuri numerotate de la Tla<sup>a</sup> până la Tla<sup>f</sup>.

Toate aceste molecule similare celor de clasa I MHC ar avea funcții biologice multiple: receptori pentru virusuri, rol în adeziune, factori de creștere, rol în exprimarea unor receptori pentru hormoni, în prezentarea antigenelor  $\gamma$ -endorfine etc. Moleculele solubile ar avea funcții de hormoni în embriogeneză și ar contribui la inducerea toleranței. Unele dintre ele sunt exprimate pe celulele tumorale care nu exprimă MHC, făcându-le să fie totuși recunoscute de către limfocitele Tc cu receptori  $\gamma\delta$ .

**Clasa a II-a de molecule** este alcătuită din lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$ , două glicoproteine heterodimere distincte de cca. 32 - 34 kD, respectiv 26 - 29 kD. Sunt legate între ele prin forțe necovalente și au fiecare un domeniu extracelular cu 195 - 199 aminoacizi și câte două legături disulfidice intralanț care formează câte două bucle,  $\alpha_1$  și  $\alpha_2$  la nivelul lanțului  $\alpha$  și  $\beta_1$  și  $\beta_2$  la nivelul lanțului  $\beta$ , un segment transmembranar cu cca. 23 aminoacizi și un domeniu intracitoplasmatic (fig. 149). Ambele lanțuri leagă hidrați de carbon. Lanțul  $\alpha$  are două catene oligozaharidice laterale, iar  $\beta$  doar una. Domeniile  $NH_2$ -terminale  $\alpha_1$  și  $\beta_1$  sunt foarte polimorfe, pe când cele  $\alpha_2$  și  $\beta_2$  sunt mai constante, fiind asemănătoare cu regiunile constante ale imunoglobulinelor. Segmentul transmembranar are cca. 25 de reziduuri de aminoacizi hidrofobi, iar cel citoplasmatic, cca. 10 - 20 de reziduuri. Domeniile  $\alpha_1$  și  $\alpha_2$  leagă hidrații de carbon la radicalii de asparagină din pozițiile 78 și 118, iar lanțul  $\beta$  leagă un glican la poziția 19. Regiunea de gene din complexul MHC care codifică pentru moleculele clasei II, denumită HLA-D, codifică de fapt pentru mai multe tipuri de molecule care au toate aceeași structură, deși există considerabile diferențe biochimice între moleculele controlate de cele trei subregiuni DP, DQ și DR. Sunt exprimate selectiv pe suprafața limfocitelor B, monocitelor și macrofagelor, pe alte celule antigen prezentatoare,

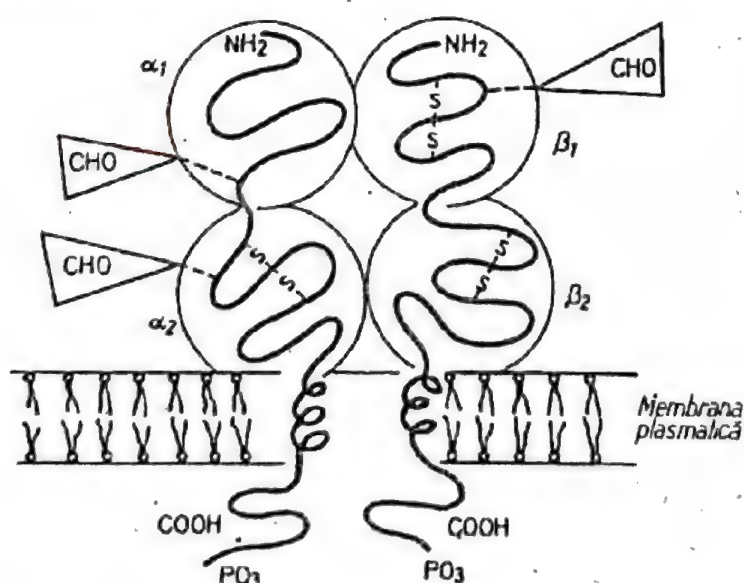


Fig.149. Antigenul MHC de clasa II. Molecula este alcătuită din două lanțuri,  $\alpha$  și  $\beta$ , fiecare cu câte două domenii ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  respectiv  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ) cu situsuri de fosforilare ( $PO_3$ ) și de atașare a hidraților de carbon (CHO) (după R.J. Duquesnoy și M. Trucco).

pe limfocitele T activate, în special pe cele T ajutătoare, pe celulele epiteliului timic. Lipsesc pe precursorii limfocitari B, apar pe suprafața limfocitelor B imunocompetente aproape simultan cu moleculele de imunoglobulină, pentru ca să dispară pe plasmocite. Exprimarea lor este activată de anticorpi anti-imunoglobulină, de IL-4, care acționează la nivelul transcripției genelor și este inhibată de IFN- $\gamma$  care blochează efectul activator al IL-4.

În cazul macrofagelor, IFN- $\gamma$  nu este antagonist cu IL-4 și, în consecință, nu are efecte inhibitoare asupra exprimării lor. Glicocorticoizii, prostaglandinele, alfa-fetoproteina, cAMP, unele virusuri inhibă sinteza sau exprimarea moleculelor de clasa a II-a MHC. Aceste molecule

se găsesc exprimate și sunt recunoscute în relație cu un antigen străin, acționând ca elemente restrictive. Restricția Th este o consecință a polimorfismului molecular de clasa I. Celulele care exprimă moleculele de clasa II le exprimă și pe cele de clasa I astfel că, din acest punct de vedere, există celule care posedă numai clasa I și care alcătuiesc cvasitotalitatea celulelor organismului, precum și unele care exprimă ambele clase și care se limitează numai la populațiile care intră în componența sistemului imun (fig. 150).

Deci, moleculele MHC de clasa I, denumite inițial și "SD" (definite serologic) și cele de clasa II denumite "LD" (definite limfocitar, adică prin reacții celulare și nu serologice) sunt sintetizate sub controlul unor gene diferite, au organizare moleculară diferită și funcții biologice distincte (tabelul 91).

Tabelul 91

Proprietățile moleculelor de clasa II și clasa I  
(după M.A. Robinson și T.J. Kindt)

Proprietatea	Molecule de clasa	
	I	II
Regiunea genelor *	K + D	I (A + E)
Rejecția grefelor	++++	+
Reacții GVH	+	++++
Funcții de stimulare în MLR	+	++++
Funcții citotoxice în MLR	++++	+
Distribuție tisulară	Ubicuitar	Pe limfocite și macrofage
Compoziție chimică	Un lanț glicoproteic cu un lanț $\alpha$ cu un lanț $\beta_2$ - microglobulinic	Două lanțuri glicoproteice ( $\alpha\beta$ )
Restricție la nivelul	Celulelor țintă	Celulelor atg-prezentatoare

\* Regiunea de la nivelul MHC la nivelul căreia se găsesc genele care controlează sinteza lanțurilor;  
GVH = reacție grefă contra gazdă; MLR = reacție mixtă limfocitară;  
+, ++, +++ = diferite intensități ale reacțiilor.

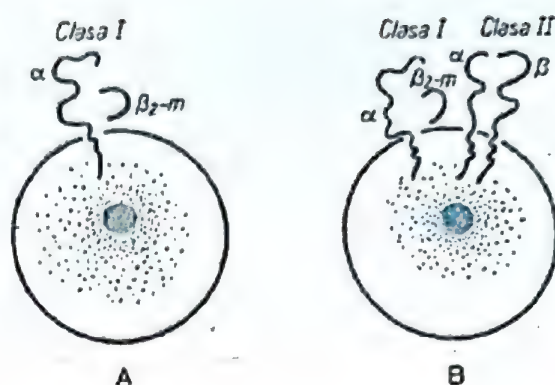


Fig.150. Antigenul MHC de clasă I este exprimat, cu mici excepții, pe toate celulele organismului (A). Antigenul MHC de clasa II este exprimat, împreună cu cel de clasa I, pe suprafața limfocitelor B, celulelor APC, pe Th activate (B).



Funcțiile biologice ale moleculelor de clasa II sunt exprimate în contextul recunoașterii antigenului prezentat de către celulele prezentatoare de antigen, limfocitele T, având rol în reglarea și restricția răspunsului imun. Acestea pot recunoaște antigenul străin numai atunci când celulele APC îl prezintă asociat cu moleculele respective jucând din acest punct de vedere rolul elementelor de restricție.

Moleculele de clasa III sunt componentele C2, C4 și factorul B (Bf) al complementului, proteina SIp legată de sexul masculin XY (sex linked protein) și o hidroxilază. Aceste molecule nu fac parte propriu-zis din MHC, fiind sintetizate sub controlul unor gene intercalate în genele acestui complex ca urmare a unei translocății.

## STRUCTURA GENELOR MHC

Complexul H-2 al șoarecelui, situat pe cromozomul 17 în vecinătatea complexului Tla, are trei regiuni de gene distincte care codifică pentru cele trei clase de molecule cu rol în recunoașterea imună și în semnalizarea intercelulară. Ca și complexul HLA de la om, complexul H-2 codifică pentru sinteza unor molecule cu un polimorfism fantastic, polimorfism care se referă la marele număr de variante existent la nivelul aceluiasi locus și, ca atare, exprimat fenotipic foarte diferit. La șoarece, regiunile K și D din complexul H-2Qa și Tla din complexul Tla codifică pentru moleculele de clasa I, regiunea I pentru cele de clasa II și regiunea S pentru cele de clasa III.

Regiunea K are două gene fiind situată spre centrometrul cromozomului 17, iar regiunea D are 5 gene la șoarecii BALB/c și doar una la B<sub>10</sub>. Regiunile Qa cu 8 gene la BALB/c și 16 la B<sub>10</sub> și Tla cu 19 la BALB/c și 15 la B<sub>10</sub> sunt situate către telomer (fig. 151). Între regiunile S și D ar mai exista regiunea G (H-2G) care codifică pentru unele enzime ce nu au nici o legătură cu funcțiile imune. Regiunea I codifică pentru lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$ , având doi loci, I-A și I-E, și nu cinci, cum se credea până nu demult (I-A, I-B, I-J, I-E și I-C). De fapt, locii A și B formează locusul A, C și E, iar I-J nu codifică direct pentru nici un lanț polipeptidic. Regiunea S codifică pentru patru molecule, D pentru trei iar Qa și Tla au loci care codifică pentru mai

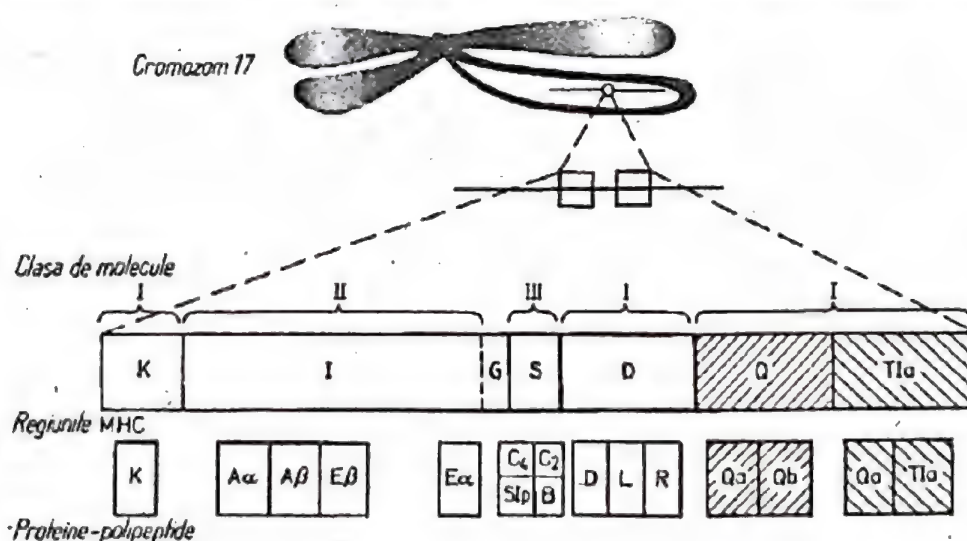


Fig.151. Organizarea regiunilor complexului H2 la șoarece.

mult de 25 de molecule din clasa I care ar funcționa în diferențierea hematopoietică și ar acționa ca ținte pentru NK. Între regiunile S și D sunt locii genelor care codifică pentru TNF- $\alpha$  și pentru limfotoxine (fig. 152). Complexul H-2 conține cel puțin 48 de gene: regiunea K conține 2 gene care codifică pentru moleculele de clasa I, regiunea I șapte gene care codifică pentru moleculele de clasa II, iar regiunile distale D și Q cuprind 13 gene care codifică pentru moleculele de clasa I și două pentru TNF- $\alpha$  și TNF- $\beta$  (limfotoxina), restul fiind în regiunea Tla. Fiecare codon are mai mulți exoni (gene active) și introni (pauze între exoni), exonii controlând sinteza fiecărui segment al lanțului peptidic. De exemplu, genele care codifică pentru lanțul polipeptidic  $\alpha$  al moleculei de clasa I au 8 exoni și 7 introni (fig. 153). Fiecare exon va dicta secvența pozițiilor unui anumit număr de reziduuri de aminoacizi în lanț.

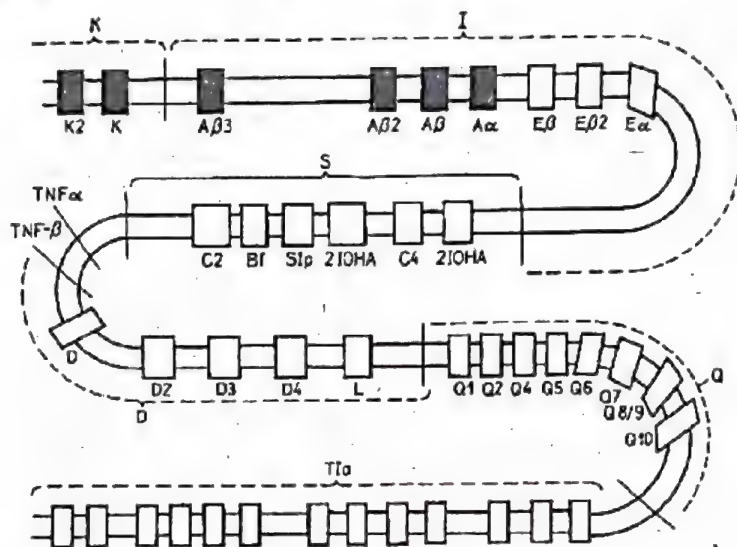


Fig.152. Sistemul H-2 cu genele care intră în componența sa. Exonii (pătratele negre și albe) care controlează sinteza diferitelor segmente ale lanțurilor sunt despărțite de introni (spațiile dintre exoni) (după M.A. Robinson și T.J. Kindt).

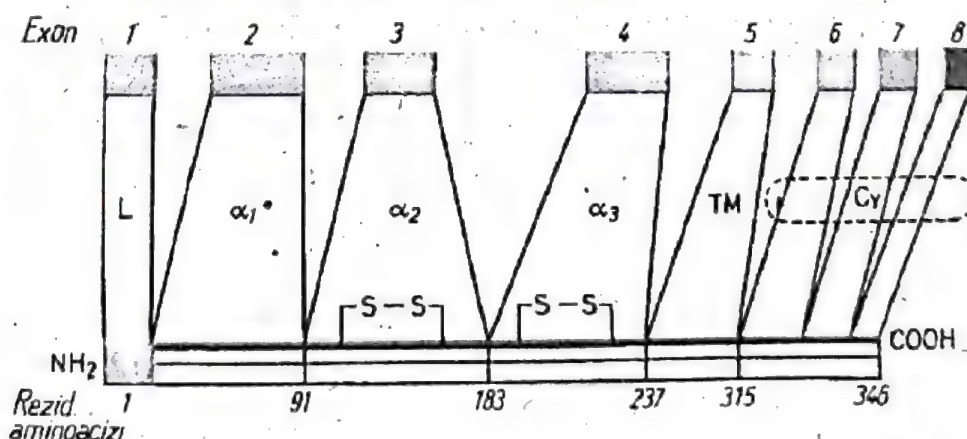


Fig.153. Poziția exonilor care codifică pentru diferite segmente ale lanțului  $\alpha$  al moleculei MHC de clasa I. Primul exon codifică pentru peptida "leader" (L) de cca. 20 de reziduuri de aminoacizi prezentă la nivelul lanțului, din momentul sintezei până la exprimarea lui pe suprafața celulei. Exonii 2,3 și 4 codifică pentru domeniile  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , și  $\alpha_3$ , fiecare având cca.90 de reziduuri de aminoacizi, exonul 5 codifică pentru segmentul transmembranar (TM) și pentru un scurt fragment din domeniul intracitoplasmatic (Cy), exonii 6,7 și 8 pentru câte 10 reziduuri de aminoacizi din restul celor 30-40 existenți spre extremitatea COOH terminală (după M.S.Robinson și T.J. Kindt).



Fig.154. Sistemul HLA. Genele care controlează sinteza antigenelor HLA la om sunt situate pe brațul scurt al cromozomului 6, fiecare locus putând fi ocupat de mai multe alele. Către centromer este gena  $\alpha$  pentru colagen de tip XI (Col11A). Urmează trei regiuni de gene sub controlul cărora se află antigenele MHC de clasele II, III și I. În regiunea II sunt gene notate cu litere și cifre. Pentru lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$  ale antigenelor de clasa II codifică genele A și B. Genele  $DR\beta 1$  și  $DR\alpha$  formează molecula DR cu 18 specificități.  $DQA1$  și  $DQB1$  codifică pentru lanțurile  $DQ\alpha$  și  $DQ\beta$  care formează molecula DQ, iar  $DPA1$  și  $DPB1$  lanțurile  $DP\alpha$  și  $DP\beta$ .

Genele de clasa III codifică pentru moleculele de complement prezente în ser, C2, C4, Bf fiind învecinate cu trei gene care codifică pentru proteinele de șoc termic (HSP70) care ar avea rol în prezentarea peptidelor de către moleculele MHC.

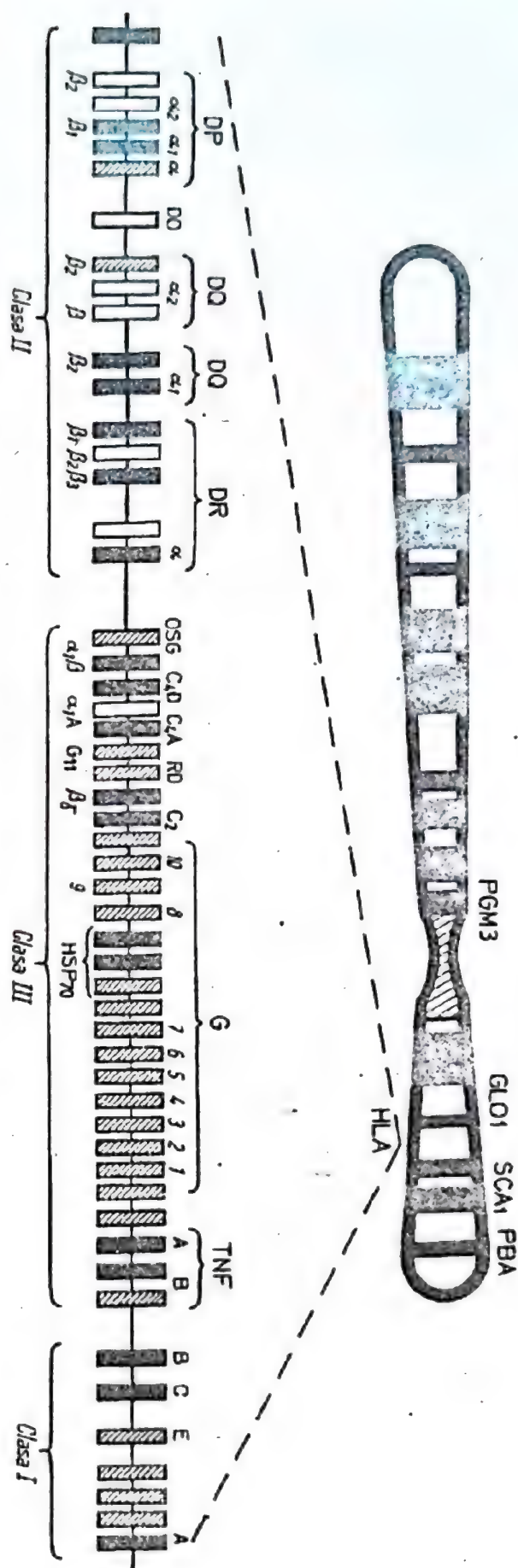
Către extremitatea distală față de centromer, sunt două gene care codifică pentru  $TNF\alpha$  și  $TNF\beta$ .

Urmează genele de clasa I (B, C, A) care codifică pentru lanțurile  $\alpha$ , o glicoproteină asociată cu  $\beta 2$ -microglobulina. Gena B are 52 de alele, C - 11 alele iar A - 24 de alele. Gena E este slab exprimată.

PBA = Polipeptidul A1 a factorului XIII de coagulare;

GLO = glioxaloză - 1;

PGM3 = fosfoglucomutază - 3.



**Complexul HLA** este situat pe cromozomul 6 la om, având în componența sa regiunile HLA-A, HLA-B, HLA-C și HLA-D. Regiunea HLA-D situată către centromer codifică pentru moleculele de clasa II-a și are trei loci denumiți DP, DQ și DR. Inițial, specificitățile acestor loci, adică moleculele sintetizate sub controlul genelor de la aceste nivele, au putut fi identificate serologic, motiv pentru care au fost denumite DR (D-related, adică în relație cu regiunea D). Către extremitatea telomerică sunt regiunile HLA-B, HLA-C și HLA-A care codifică pentru moleculele de clasa I, cele mai polimorfe fiind regiunile HLA-A și HLA-B cu 23 și 49 de haplotipuri (haplotip = set de gene localizat pe un cromozom, care au o exprimare fenotipică unică). Locusul HLA-C are numai 8 haplotipuri. Între HLA-D și HLA-B sunt situate genele care codifică pentru moleculele de clasa III, adică pentru C2, C4, SIp și factorul B al complementului (fig. 154).

Gena tipică HLA al clasei I are opt exoni, primul codificând pentru o secvență cu cca. 18 nucleotide urmat de codoni pentru leaderul hidrofob cu 24 de aminoacizi, responsabil de inserția lanțului greu la membrana plasmatică. Exonii 2,3 și 4 codifică pentru domeniile  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  și  $\alpha_3$ , ultimul fiind omolog cu regiunea constantă (C) a imunoglobulinelor și având ca atribut funcțional, printre altele, și pe cel de legare a lanțului  $\beta$ -microglobulină. Exonul 5 codifică pentru segmentul transmembranar iar 6, 7 și 8 pentru cel citoplasmic (fig. 155).

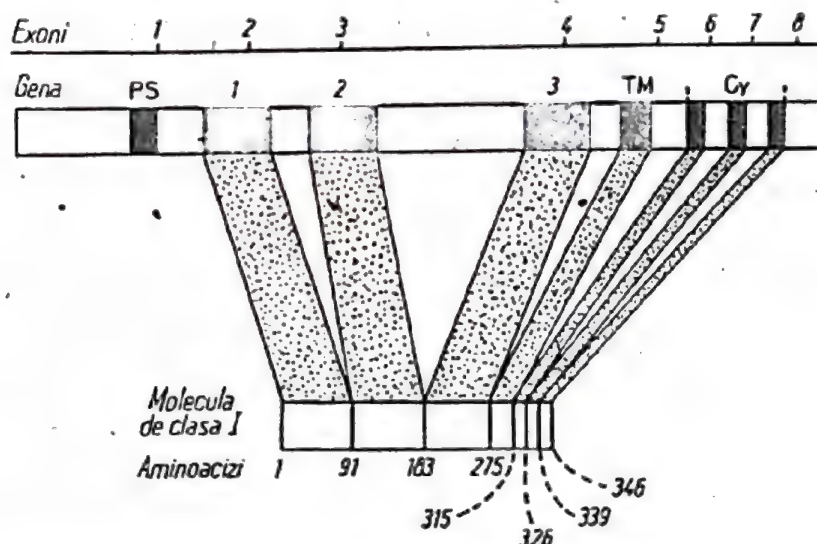


Fig.155. Reprezentarea schematică a organizării exonilor (pătratele negre) și intronilor (spații albe) genei care codifică pentru sinteza moleculelor de clasa I HLA în relație cu secvența aminoacizilor din lanțul polipeptidic. PS = proteină semnal; Cy = segmentele domeniului intracitoplasmatic; TM = segmentul transmembranar (după R.J.Duquesnoy și M. Trucco).

Genele care codifică lanțurile polipeptidice ale moleculelor de clasa II au de asemenea o organizare exon-intron care corespunde domeniilor structurale ale moleculei. Primul exon codifică pentru o secvență leader iar restul pentru domeniile  $\alpha_1$  sau  $\beta_1$ ,  $\alpha_2$  sau  $\beta_2$  etc. (fig 156).

În cazul genelor care controlează sinteza moleculelor de clasa III, în cursul evoluției, au fost păstrate cel puțin două tipuri distincte: unul cu genele care controlează sinteza C4, SIp și hidrolazele 21 (21 OHA). Ca și la șoarece, genele care codifică pentru moleculele de clasa III sunt inserate între cele ale moleculelor de clasa II (DR) și clasa I, (BCA) cu excepția faptului că, în sistemul HLA, toate genele clasei I ocupă loci spre extremitatea telomerică a cromozomului și nu sunt



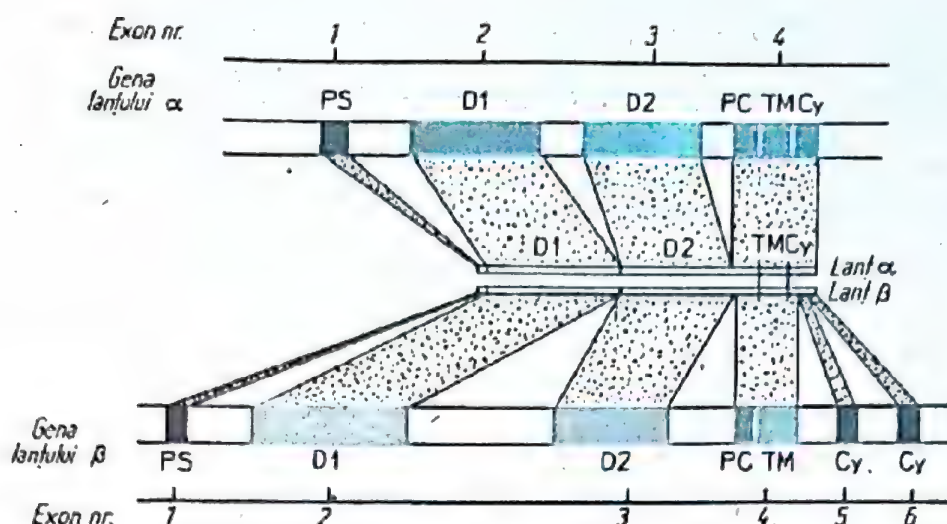


Fig.156. Exonii (pătratele negre) și intronii (pătratele albe) genei care controlează lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$  ale heterodimerului de clasa II. PS = proteina semnal; PC = peptida de conectare a domeniilor extracelulare (D1 $\alpha$ 1 sau  $\beta$ 1; D2 $\alpha$ 2 sau  $\beta$ 2) cu cele transmembranare (TM) și intracitoplasmatic (Cy). În cazul lanțului  $\alpha$  exonii care controlează domeniul citoplasmatic (Cy) nu sunt despărțiți prin introni de cei care controlează sinteza segmentului transmembranar. Lanțul  $\beta$ , în cazul segmentului citoplasmatic Cy, formează două unități despărțite de introni (după R. Duquesnoy și M. Trucco).

divizate ca la șoarece în loci situați atât spre extremitatea telomerică, cât și spre cea centrometrică (fig. 157).

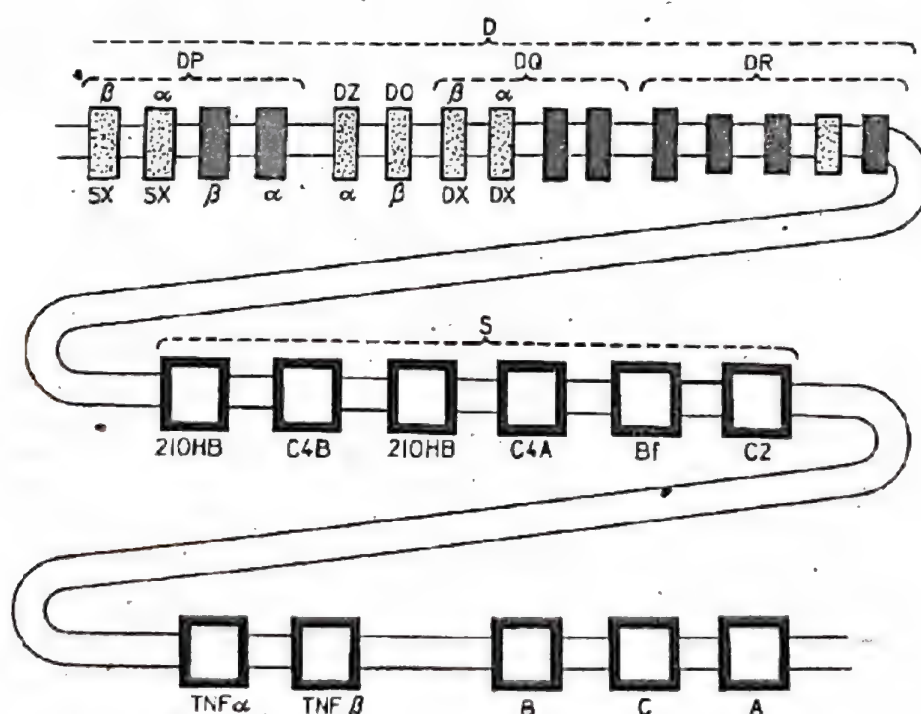


Fig.157. Harta genetică a complexului HLA de la nivelul cromozomului 6. Regiunea D are trei subregiuni (DP, DQ, DR) cu gene active (dreptunghiurile negre) și cu pseudogene (dreptunghiurile punctate). La nivelul fiecărei subregiuni sunt gene care codifică pentru lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$  ale moleculelor de clasa II. Între regiunea S (III) și I (B, C, A), reprezentate prin pătrate albe cu marginile groase, sunt genele pentru TNF  $\alpha$  și  $\beta$  (după I. Roitt și col.).

Fiecare locus al genelor de la nivelul complexului HLA poate controla sinteza unui mare număr de specificități antigenice care pot fi detectate serologic. Datorită potențialului de legare încrucișată, între genele de pe diverși loci, posibilitatea de variație a specificităților este enormă. Din această cauză, pe lângă OMS, funcționează un Comitet Internațional care datorită ratei rapide a acumulărilor de cunoștințe privind secvența ADN pentru genele și alelele HLA, se întrunește anual pentru a standardiza și ordona cunoștințele acumulate. La întrunirea "Comitetului pentru Nomenclatură HLA" din 1 VIII 1990, s-a stabilit nomenclatura pentru alelele și specificitățile HLA, redată în tabelul 92.

Tabelul 92

**Nomenclatura factorilor pentru sistemul HLA**  
(după J.G. Bodmer și col)

Regiunea	Alela HLA	Specificitatea	Regiunea	Alela HLA	Specificitatea
DP	DPA1 0101	-	DQ	DQA1 0601	
	DPA1 0102	-		DQB1 0501	DQw5
	DPA1 0103	-		DQB1 0502	DQw5
	DPA1 0201	-		DQB1 0503	DQw5
	DPB1 0101	DPw1		DQB1 0601	DQw6
	DPB1 0201	DPw2		DQB1 0603	DQw6
	DPB1 0202	DPw2		DQB1 0604	DQw6
	DPB1 0301	DPw3		DQB1 0201	DQw2
	DPB1 0401	DPw4		DQB1 0301	DQw7
	DPB1 0402	DPw4		DQB1 0302	DQw8
	DPB1 0501	DPw5		DQB1 0303	DQw9
	DPB1 0601	DPw6		DQB1 0401	DQw4
	DPB1 0801	-		DQB1 0402	DQw4
	DPB1 0901	-	DR	DRB1 0101	DR1
	DPB1 1001	-		DRB1 0102	DR1
	DPB1 1101	-		DRB1 0103	DR' BR'
	DPB1 1301	-		DRB1 0501	DRw15
	DPB1 1401	-		DRB1 1502	DRw15
	DPB1 1501	-		DRB1 1601	DRw16
	DPB1 1601	-		DRB1 1602	DRw16
	DPB1 1701	-		DRB1 0301	DRw17
	DPB1 1901	-		DRB1 0302	DRw18
DQ	DQA1 0101	-		DRB1 0401	DR 4
	DQA1 0102	-		DRB1 0402	DR 4
	DQA1 0103	-		DRB1 0403	DR 4
	DQA1 0201	-		DRB1 0404	DR 4
	DQA1 0301	-		DRB1 0405	DR 4



Regiunea	Alala HLA	Specificitatea
DR	DRB1 0408	DR4
	DRB1 1101	DRw 11
	DRB1 1102	DRw11
	DRB1 1103	DRw11
	DRB1 1104	DRw11
	DRB1 1201	DRw12
	DRB1 1301	DRw13
	DRB1 1302	DRw13
	DRB1 1303	DRw13
	DRB1 1401	DRw14
	DRB1 1402	DRw14
	DRB1 0701	DR7
	DRB1 0702	DR7
	DRB1 0801	DRw8
	DRB1 0802	DRw8
	DRB1 0803	DRw8
	DRB1 091	DR9
	DRB1 1001	DRw10
	DRB3 0101	DRw52a
	DRB3 0201	DRw52b
	DRB3 0202	DRw52b
	DRB3 0301	DRw52c
	DRB4 0101	DRw53
	DRB5 0101	DRw15
	DRB5 0102	DRw15
	DRB5 0201	DRw16
	DRB5 0202	B7
B	B 0701	B7
	B 0702	B8
	B 0801	B13
	B 1301	B13
	B 1302	B13
	B 1401	B14
	B 1402	Bw65
	B 1501	Bw 62
	B 1801	B 18
	B 2701	B 27
	B 2702	B 27

Regiunea	Alala HLA	Specificitatea
B	B 2703	B 27
	B 2704	B 27
	B 2705	B 27
	B 2706	B 27
	B 3501	B 35
	B 3701	B 37
	B 3801	B 38
	B 3901	B 39
	B 4001	Bw 60
	B 4002	B 40
	B 4101	Bw 41
	B 4201	Bw 42
	B 4401	B 44
	B 4402	B 44
	B 4601	Bw46
	B 4701	Bw 47
C	B 4901	B 49
	B 5101	B 51
	B 5201	Bw 52
	B 5701	Bw42
	B 5801	Bw 57
	Cw 0101	Cw 1
	Cw 0201	Cw 2
	Cw 0202	Cw 2
	Cw 0301	Cw 3
	Cw 0501	Cw 5
A	Cw 0601	Cw 6
	Cw 0701	Cw 7
	Cw 1101	Cw 11
	Cw 1201	-
	Cw 1301	-
	Cw 1401	-
	A 0101	A 1
	A 0201	A 2
	A 0202	A 2
	A 0203	A 2
	A 0204	A 2
	A 0205	A 2

Regiunea	Alela HLA	Specificitatea	Regiunea	Alela HLA	Specificitatea
A	A 0206	A 2	A	A 2901	A 29 (w19)
	A 0207	A 2		A 3001	A 30 (w19)
	A 0208	A 2		A 3101	A 31 (w19)
	A 0210	A 2		A 3201	A 32 (w19)
	A 0301	A 3		A 3301	Aw 33 (w19)
	A 0302	A 3		A 6801	Aw 68
	A 1101	A 11		A 6802	Aw 68
	A 2401	A 24		A 6901	Aw 69
	A 2501	A 25			
	A 2601	A 26			

Cu această ocazie, pe baza secvenței ADN a fost stabilită existența a 25 de alele HLA-A, 32 HLA-B și 11 HLA-C, 14 alele DPA-1, 19 DPB-1 etc. Cele încă insuficient definite sunt notate cu w. Observațiile clinice și de laborator, bazate mai mult pe date statistice, au semnalat o asociere frecventă a unor antigene HLA cu anumite boli (tabelul 93). Dintre toate, se pare că cea mai justificată este asocierea specificității B27 cu spondilita anchilozantă, aproape 90% din pacienți prezentând această specificitate alotipică. În alte maladii, ca de exemplu în scleroza multiplă, boala Graves etc., asocierea cu anumite specificități este minoră și, ca atare, discutabilă.

Tabelul 93

Boli asociate cu unele antigene HLA (după I. Roitt)

Boala	Antigenul	Risc relativ	Boala	Antigenul	Risc relativ
Spondilita anchilozantă	B 27	87,8 %	Psoriazis	A 1	2,1 %
Maladia Reiter	B 27	35,9 %		B 13	8,7 %
Artrita reumatoidă	DRw 4	4,0 %		Bw 37	8,1 %
Scleroza multiplă	A 3	1,8 %		Cw 6	4,3 %
	B 7	2,0 %	Boala Addison	Dw 3	8,8 %
	Bw 2	1,9 %			
	DRw 2	3,8 %	Boala Graves	B 8	2,5 %
Miastenia gravis	B 8	3,4 %		Bw 35	5,0 %
	DRw 3	3,0 %		Bw 3	5,5 %
			Hemocromatoza	A 3	9,0 %
			Hepatita cronică	B 8	9,2 %
				DRw 3	4,6 %

Acum este pe deplin dovedit faptul că genele MHC sunt membre ale superfamiliei de gene imunoglobulinice cu rol în funcțiile de recunoaștere atât a structurilor proprii cât și a celor străine de organism. Proteinele codificate de către ele au o complexitate de atribute biologice, responsabilitatea lor în in-



dividualizarea din punct de vedere antigenic a fiecăruia dintre noi fiind de importanță capitală.

În exprimarea antigenelor controlate de către sistemul H-2 murin sau HLA uman, pe lângă asemănările care merg până la identitate, există și unele deosebiri. Astfel, dacă genele sistemului HLA și-au păstrat poziția ancestrală, în sensul că locii celor care controlează sinteza antigenelor de clasa II sunt situate la o extremitate a complexului, cele ale sistemului H-2, respectiv regiunea K, și-au pierdut poziția telomerică.

Există o diferență în distribuția tisulară a antigenelor de clasa I și II, în sensul că, la om, dar nu la șoarece, antigenele de clasa II sunt exprimate și pe limfocitele T activate. Dar, atât la om cât și la alte specii antigenele MHC intră în componența complexului trimolecular receptor pentru antigen+antigen+MHC, realizând recunoașterea epitopului de către limfocitul T "sub restricție MHC". Ele conferă statut de "reactant" sau "nereactant" diferiților indivizi față de un anumit antigen și participă efectiv la selecția pozitivă și negativă a limfocitelor.

În afară de importanța cunoștințelor fundamentale privind rolul biologic al sistemului MHC, acestea au și aplicații practice, în sensul precizării asocierii lui cu unele boli, al înțelegerii și stăpânirii mecanismelor de reacție a transplantelor de organ, expertizei paternității etc.

## BAZA GENETICĂ PENTRU DIVERSITATEA UNITĂȚILOR DE RECUNOAȘTERE A ANTIGENULUI

### CONTROLUL GENETIC AL SINTEZEI IMUNOGLOBULINELOR

Caracteristica principală a efectorilor sistemului imun o reprezintă diversitatea posibilităților lor de recunoaștere, grație cărora organismul poate face distincția dintre structurile lui proprii, pe care le tolerează, și cele non-proprii, pe care le respinge. La nivel de anticorp, recunoașterea se realizează prin fixarea suprafeței interioare a situsului combinativ, care are o formă complementară antigenului (de unde și denumirea de "paratop"), la epitop, diversitatea epitopilor existenți în natură impunând aceeași diversitate și la nivelul paratopilor. Dar, diversitatea anticorpilor nu se manifestă numai la nivelul situsului combinativ, ci și la nivelul altor regiuni ale moleculei, cu funcții biologice bine definite. De exemplu, fragmentul Fc al IgE se leagă la receptorul Fc de pe mastocite, pe când Fc de la IgG, pe receptorul Fc de pe macrofage, celule K etc. Dacă se ia în considerare și diversitatea de specificități izotipice, alotipice, idiotipice, atunci enorma diversitate a imunoglobulinelor devine și mai evidentă. Se estimează că un individ produce mai multe tipuri de molecule de imunoglobulină decât tipurile de molecule de proteină care alcătuiesc întregul său organism sau, altfel spus, produce mai multe tipuri de anticorp decât numărul genelor pe care le are în genom.

Prima teorie care încerca să explice această enormă diversitate a anticorpilor a fost cea a "lanțurilor laterale" emisă de P. EHRLICH în anul 1900. Conform acestei teorii, anticorpii sunt constituenți preformați care se găsesc la nivelul membranei celulare ca receptori de membrană. Combinarea antigenului cu receptorii preformați de pe limfocit activează celula și o determină să "fabrice" un număr sporit de receptori care se desprind de pe membrană și ajung în circulație. P. EHRLICH s-a apropiat foarte mult de adevăr, deși considera că aceeași celulă are receptori cu specificități de anticorp diferite, fapt care nu corespunde realității. El a anticipat



însă atât teoria selecției clonale, cât și ideea că sistemul imun poate genera receptori cu mult înainte de a veni în contact cu antigenul, receptori care au structura de anticorpi. Deci, la nivel celular anticorpii sunt preexistenți.

K. LANDSTEINER constată însă că celulele pot produce anticorpi și față de antigene artificiale, care nu există în natură. Această constatare a pus sub semnul întrebării valabilitatea teoriei lui EHRLICH, deoarece era greu de imaginat faptul că organismul poate să-și mențină prin selecție naturală gene care să controleze și sinteza anticorpilor față de compuși artificiali. Ca atare, s-au dezvoltat "teoriile instructive", conform cărora anticorpii sunt produși sub influența antigenului care nu selecționează moleculele preformate ci le "instruiește" formarea, acționând ca o matriță care imprimă pe un material moale amprenta propriei sale conformații. Rezultă molecula de imunoglobulină cu o formă complementară antigenului.

P. EHRLICH a fost autorul "teoriei selective" iar K. LANDSTEINER al celei "instructive" a sintezei imunoglobulinelor. Conform "teoriei selective", limfocitele au gata pregătiți receptori de membrană care sunt recunoscuți specific de către antigene, recunoaștere care duce la desprinderea lor de pe celulă și trecerea în circulație, sub formă de molecule libere de anticorp.

"Teoria instructivă" susținea că nu există receptori preformați, ei fiind sintetizați sub influența antigenului care acționează asupra celei ca o "matriță" asupra unui material moale, lăsând "amprenta" asupra acestuia, "amprentă" care nu ar fi altceva decât anticorpul. Diferența dintre aceste două teorii ar putea fi comparată cu situația în care se găsește cineva care dorește să-și procure un costum de haine. El poate să le ia din magazin, unde le găsește cusute gata, trebuind doar să-și aleagă (selecție) măsura potrivită lui, sau poate merge la croitor pentru a i se lua măsura corpului (instructiv) și a-i coase hainele după aceasta.

Progresele biologiei moleculare și imunologiei au infirmat validitatea teoriilor instructive, N. JERNE și M. BURNET readucând în actualitate conceptul selectiv al formării anticorpilor emis de P. EHRLICH la începutul secolului. A fost emisă "teoria selecției clonale", conform căreia populația limfocitară este alcătuită dintr-un număr mare de clone, celulele fiecărei clone având un receptor unic pentru antigen; fiecare celulă produce numai un tip de moleculă de imunoglobulină, antigenul selectând și stimulând celula care poartă imunoglobuline cu specificitate de anticorpi față de el.

Dar cum se poate explica totuși enorma diversitate a moleculelor de imunoglobulină? Două teorii încearcă să explice mecanismele care stau la baza generării diversității: teoria "liniei germinative" și "teoria mutației somatice".

Conform *teoriei liniei germinative*, ar exista în genom câte o genă pentru fiecare specificitate de anticorpi. Ar fi deci gene care ar codifica pentru regiunile V și gene care ar codifica pentru regiunile C ale lanțului L sau H. Dar un lanț L are o regiune V și una C, iar un lanț H are o regiune V și trei sau patru regiuni C. Cum este posibil ca genele care codifică pentru V să fie atât de variabile, iar cele care codifică pentru C, deși aproximativ egale cu cele V, să rămână constante, neinfluențate de diverși factori mutaționali din mediu? S-a încercat rezolvarea acestei dileme acceptându-se ideea că regiunea V este codificată de un număr mare de gene, iar regiunea C de o genă sau un număr mic de gene.

*Teoria mutațiilor somatice* consideră că este imposibil ca genomul să conțină un număr atât de mare de gene care să poată acoperi întreaga diversitate a moleculelor de imunoglobulină. Ea propune intervenția unor mutații care fac ca un număr mic de gene din genom să genereze diversificări mari.



În prezent sunt trei mecanisme prin care se explică diversitatea anticorpilor, respectiv generarea diferitelor regiuni  $V_H$  sau  $V_L$ . Aceste mecanisme ar fi:

1. Existența unui număr mare de gene separate, fiecare dintre ele codificând pentru un anumit segment de lanț  $V_H$  sau  $V_L$  (teoria liniei germinative);
2. Existența unei gene  $V$  primordiale care, în timpul ontogeniei limfocitului  $B$ , suferă mutații ce produc gene diferite exprimate la nivelul diferitelor clone de celule (teoria mutației somatice);
3. Existența unui număr de segmente de gene de unire ( $J$ ) care se recombina în timpul ontogeniei limfocitului  $B$  cu o parte principală a genei unice  $V$ . Diferitele segmente de gene vor codifica diferite segmente de lanț polipeptidic (ipoteza recombinărilor somatice).

Se pare că toate aceste trei mecanisme intervin în generarea diversității anticorpilor.

#### EVENIMENTELE CARE CONTROLEAZĂ SINTEZA MOLECULEI DE IMUNOGLOBULINĂ

În linii mari, secvența evenimentelor care controlează sinteza moleculei de imunoglobulină este următoarea:

- a) sinteza lanțurilor polipeptidice (cronologic, sinteza lanțurilor  $H$  precede sinteza celor  $L$ );
- b) asamblarea moleculelor de imunoglobulină;
- c) adăugarea componentelor glucidice;
- d) polimerizarea și eliminarea moleculelor de imunoglobulină;
- e) comutarea sintezei moleculelor de imunoglobulină.

**Controlul genetic al sintezei lanțurilor imunoglobulinelor.** La nivelul liniei germinative există trei grupe de gene, dintre care două controlează sinteza lanțului  $L$ , cu specificitățile  $\lambda$  și  $k$ , iar a treia pe cea a lanțului  $H$ . La om, genele pentru lanțul  $L_k$  sunt localizate pe cromozomul 2, cele pentru  $L_\lambda$  pe cromozomul 22, iar cele pentru lanțul  $H$  pe cromozomul 14. În fiecare grupă există *transloconi* cu gene care codifică pentru regiunea  $V$  și cu gene care codifică pentru regiunea  $C$  a lanțului. Așadar, în componența fiecărui translocon (șir de gene care codifică pentru un lanț polipeptidic complet) există cistroni diferiți cu gene care codifică pentru o anumită secvență a aminoacizilor dintr-un lanț polipeptidic (tabelul 94). Fiecare genă  $V$  codifică pentru regiunea variabilă, de la reziduul nr. 1 până la poziția 95 - 96 și pentru 4 reziduuri de aminoacizi dintr-o "peptidă semnal". Restul de 15 - 18 reziduuri ale acestui peptid este codificat de un segment mic  $L$  (leader). Ultimii 12 - 13 aminoacizi ai regiunii  $V_L$  și  $V_H$  sunt codificați de un segment de "joncțiune" ( $J$ ) care face legătura cu segmentele constante codificate de gena  $C$ .

Tabelul 94

Transloconi și cistroni cu gene care codifică pentru molecule de imunoglobulină

Lanț	Transloconi	Cistroni	
		$V$	$C$
$L$	Kappa ( $k$ )	$V_k$	$C_k$
	Lambda ( $\lambda$ )	$V_{\lambda_1}; V_{\lambda_2}$	$C_{\lambda_1}; C_{\lambda_2}$
$H$	Heavy	$V_H$	$C_H (\mu, \gamma, \alpha, \delta, \epsilon)$

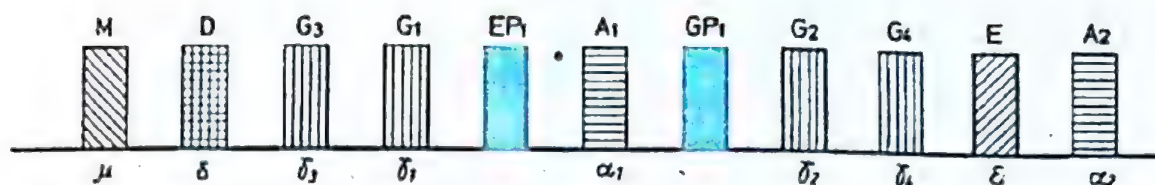


Fig.158. Poziția genelor care codifică pentru clasele și subclasele de imunoglobuline umane. Dreptunghiurile negre sunt nefuncționale.

În procesul de sinteză și diferențiere, prin translocații simultane sau succesive, porțiunile de lanț codificate de către genele V se pot insera la secvențele codificate de genele C, astfel că o moleculă de imunoglobulină, deși aparține unui izotip unic, poate avea un spectru extrem de larg de specificități idiotipice. Altfel spus, o moleculă poate să aparțină la clase diferite, deci cu regiuni C diferite ale lanțului H, dar să aibă specificitate de anticorp unică. Așadar, genele imunoglobulinice sunt asamblate din segmente discontinue din linia germinativă, care sunt juxtapuse în timpul dezvoltării limfocitului B.

La om, genele care codifică pentru sinteza imunoglobulinelor se înșiruie în ordinea M-D-G3-G1-EP1-A1-GP1-G2-G4-E-A2; genele EP1 și GP1 fiind pseudogene nefuncționale (fig.158). Fiecare genă posedă mai mulți exoni corespunzând domeniilor C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> și C<sub>H3</sub> ale imunoglobulinelor IgG, IgA și IgD și C<sub>H1</sub>-C<sub>H4</sub> în cazul celor IgM și IgE.

Sinteza lanțului L<sub>λ</sub> este controlată de către un număr redus de gene care codifică pentru cei cca. 95 de aminoacizi ai regiunii V, de către gene J care codifică pentru restul de 13 aminoacizi din V și de către o genă C care codifică pentru cei cca. 108 aminoacizi ai regiunii C (fig. 159). La nivelul liniei germinative, genele V

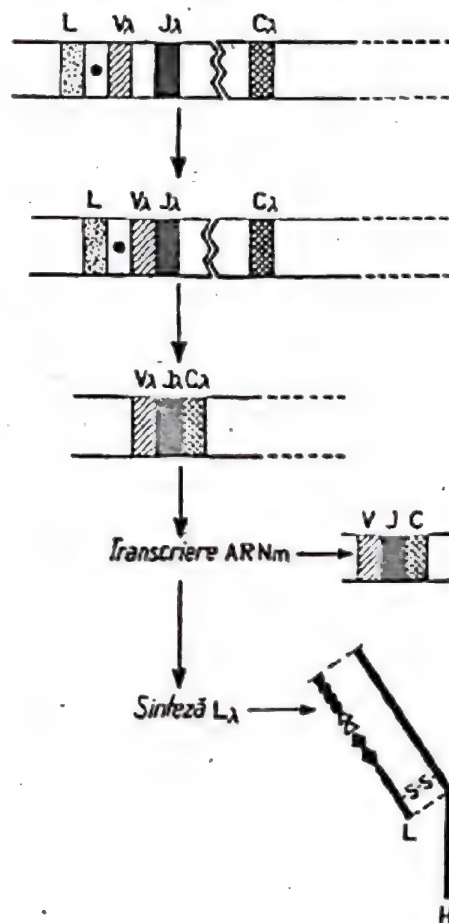


Fig.159. Controlul genetic al sintezei lanțului L<sub>λ</sub>. La nivelul liniei germinative, genele V<sub>λ</sub> și J<sub>λ</sub> sunt distanțate și precedate de niște nucleotide care codifică sinteza unui fragment al lanțului L alcătuit din cca. 17-20 de reziduuri de aminoacizi (leader hidrofobic). Genele operaționale sunt separate de introni care sunt eliminați prin deleție, permițând astfel unirea, inițial a genelor V<sub>λ</sub>J<sub>λ</sub> și, ulterior, a acestora cu C. Urmează transcrierea informației în ARNm și sinteza lanțului L (după O.G. Bier și col.).



și  $J$  sunt distanțate, apropiindu-se unele de altele în cursul maturării funcționale a limfocitului. Genele  $V$  sunt precedate de către un număr redus de nucleotide, care codifică sinteza unui fragment constituit din 17 - 20 de aminoacizi din lanțul  $L$ , numit "leader hidrofobic" (conductor hidrofobic sau "peptida semnal"), important pentru transportul în cavitatea reticulului endoplasmatic. După transport, peptida este eliminată de o peptidază.

Toate genele imunoglobulinelor (ca de altfel și celelalte gene) sunt alcătuite din porțiuni de ADN care codifică (exoni) și din porțiuni "mute" care nu codifică (introni), dar care separă exonii. Între grupele de gene  $L$  și  $V$  se interpun introni care le separă. În cursul maturării funcționale, deci la trecerea de la forme de limfocit  $B$  de memorie la plasmocit, intronul dintre  $V$  și  $J$  este eliminat (deleție), astfel încât  $V_L$  se unește cu  $J_L$ , formând complexul  $VJ$ . Acest complex fuzionează cu  $C_L$ , realizându-se translocarea  $V_L J_L C_L$  care va înscrive informația în ARNm, iar acesta, la rândul său, o va traduce la nivelul ribozomilor în vederea sintezei lanțului  $L_L$ . Numărul relativ mic de gene care controlează sinteza lanțului  $L_L$  ar explica proporția mică de molecule de imunoglobulină prezente în circulație la șoarece (cca. 5%) și chiar și la om (cca. 40%) care au astfel de lanțuri în structura lor.

**Sinteza lanțurilor  $L_k$ .** Numărul genelor  $V_k$  care codifică pentru 95 de aminoacizi din domeniul variabil  $V_L$  este mai mare decât cel al genelor  $V_L$  (cca. 300-600  $V_k$  în comparație cu câteva gene  $V_L$ ). De asemenea există nu unul, ci 5 segmente  $J$ , dintre care numai 4 sunt active și codifică pentru restul de 13 aminoacizi din  $V_L$ . Genele sunt despărțite de introni, asamblarea  $VJC$  realizându-se prin deleție și unire (fig. 160). În linia germinativă, genele  $V_k$  și  $J_k$  sunt îndepărtate și despărțite prin introni, pentru ca în cursul maturării limfocitului să fie aduse în apropiere.

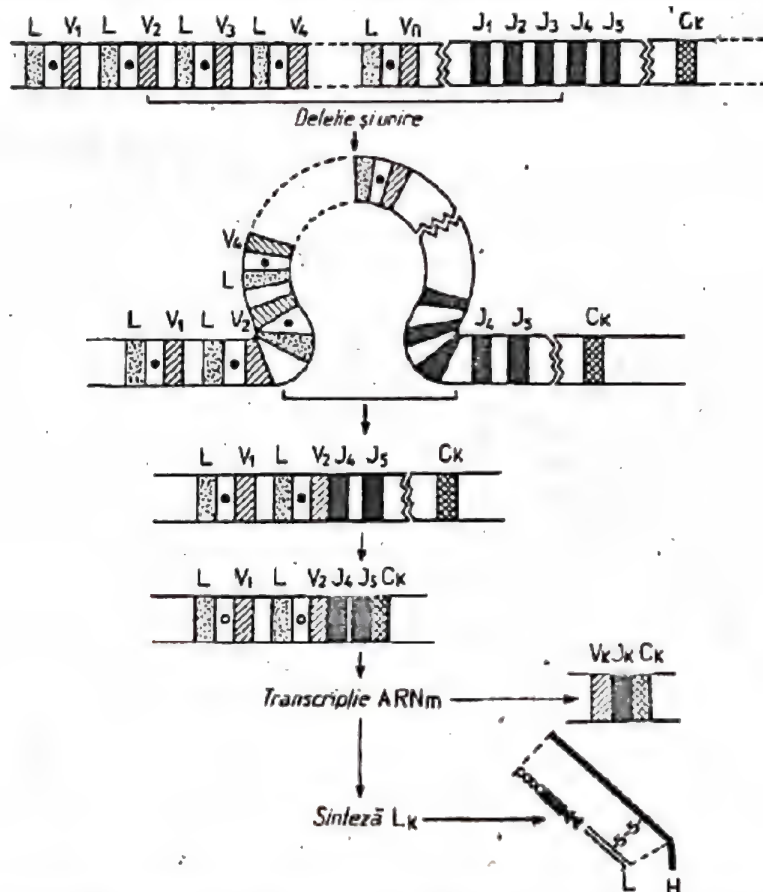


Fig.160. Controlul genetic al sintezei lanțului  $L_k$ . Numărului genelor  $V_k$  și al segmentelor  $J$  este mai mare decât la lanțul  $L_L$ . Transcrierea informației la nivelul ARNm și sinteza lanțului se realizează prin deleția intronilor și unirea exonilor (după O.G. Bier și col.).

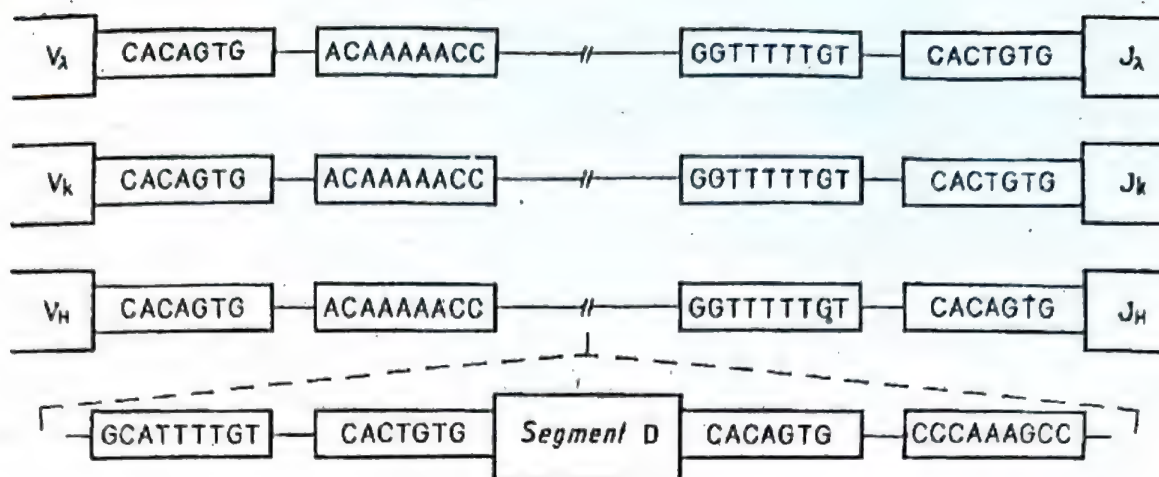


Fig.161. Reprezentarea schematică a semnalelor de joncțiune  $V_L - J_L$ ,  $V_k - J_k$  și  $V_H - D - J_H$ . A=alanină; C=cisteină; G=glicină; T=treonină. (după M.P. Lefranc și G. Lefranc).

Ansamblul VJC este transcris într-un ARN premesager, apoi secvențele ARN care corespund intronilor și secvențelor  $J_k$  "mute" sunt excizate, realizându-se un "mARN matur" care este "tradus" la nivel ribozomal în lanț L. Rearanjamentul V-J se face grație semnalelor de joncțiune *heptamer-nonamer* recunoscute de "recombinaze".

Fiecare genă V este urmată de un heptamer cu secvența CACAGTG și un nonamer ACAAAAACC separate prin 12 nucleotizi. Segmentele J sunt precedate de nonamerul GGT TTTTGT și de un heptamer GACTGTG separate de 23 de nucleotizi (fig. 161).

Numărul mare de gene  $V_k$  conferă o posibilitate sporită de variabilitate a  $V_L$ , posibilitate multiplicată de 4 ori datorită existenței a 4 tipuri de secvențe J ( $600 V_k \cdot 4J = 2400$ ). Acest fapt ar explica proporția crescută de molecule de imunoglobulină, care au în componența lor lanțuri  $L_k$  (cca. 95%) și posibilitatea sporită a acestor lanțuri de a contribui la variabilitatea situsurilor combinate ale moleculelor.

**Sinteza lanțurilor H.** Cistronul  $V_H$  conține un număr mare de gene, separate de introni și precedate de secvența L. În componența  $V_H$  sunt nu două, ci trei tipuri diferite de secvențe de gene: unul conține cca. 400 de gene V, altul 20 de D care codifică pentru a treia regiune hipervariabilă și al treilea tip, pentru 4 gene J. În "linia germinativă" (configurația genică nearanjată), semnalele de joncțiune heptamer-nonamer ale  $V_H$  și  $J_H$  sunt separate de 23 de nucleotide, iar cele ale segmentului D de 12 - 13 nucleotide. Pentru sinteza unui lanț H, în precursorii celulelor B sunt necesare două rearanjări, și anume: a) joncțiunea unui segment J la un segment D și b) joncțiunea unui segment  $V_H$  la ansamblul JD.

În prima etapă a activării, segmentele D și J sunt aliniate prin intervenția unei "exonucleaze" care taie heptamerul adiacent secvențelor, eliminându-l sub formă de "bucă de excizie". Exonucleaza acționează asupra punctelor de tăiere, o dezoxinucleotidil-transferază terminală adaugă dezoxinucleotizii, o ADN-polimerază replică bazele neadăugate și o ligază definitivează joncțiunea. Datorită existenței segmentului D (de diversitate) și unui număr mare de gene V, combinația VDJ poate controla sinteza unui număr mare de lanțuri H cu diferite specificități. Ar fi, după unii, cca.  $400 V \cdot 20 D \cdot 4 J = 32000$  de posibilități de variație pentru  $V_H$ . După alții, ar fi cca. 80 V și 50 D.



Dar situsul combinativ al unei molecule este alcătuit și din  $V_L$ , așa că, teoretic, în combinația  $V_H + V_K$  ar fi  $600 V_K \cdot 4 J_K = 2400 \cdot 32000 = 7,68 \cdot 10^7$  posibilități de formare a diferitelor tipuri de situs combinativ.

Potențialul de variație este însă mult mai mare, deoarece evenimentele translocationale care duc la unirea genelor  $VJ$  sau a celor  $VDJ$  pot varia ușor, realizând așa-zisa "variabilitate în flexibilitatea de legare". Mai mult, mutațiile somatice spontane care intervin în cursul diferențierii limfocitelor și care conduc la codificarea diferită a unui aminoacid în secvența lanțului polipeptidic contribuie și ele la sporirea variabilității.

În esență, diversitatea considerabilă a regiunilor variabile ale imunoglobulinelor s-ar explica prin:

- a) Existența unui număr mare de gene  $V$  care codifică pentru diferite segmente variabile;
- b) Posibilitatea unor combinații multiple  $VJ$ ;
- c) Existența de recombinări intergenice în familia genelor  $V$ ;
- d) Realizarea unei mari variabilități la locul de recombinare;
- e) Realizarea de modificări în poziția aminoacizilor date de mutațiile somatice punctiforme, cu referire specială la genele  $V$  și  $J$ .

În acest mod, o cantitate relativ mică de informație genetică existentă în linia germinativă poate controla un număr uriaș de molecule cu diverse specificități de anticorp.

Pentru  $C_H$ , codifică de trei sau patru ori mai multe gene decât pentru  $C_L$ . Diferența este explicabilă deoarece  $C_H$  este de 3 sau 4 ori mai lung decât  $C_L$ . De exemplu, în genomul șoarecelui, imediat după genele  $J$  urmează genele care codifică pentru  $C_H$  în ordine  $\mu, \delta, \gamma3, \gamma1, \gamma2b, \gamma2a, \epsilon$  și  $\alpha$ . În realitate, ordinea este mai complexă, deoarece există gene care codifică pentru fiecare domeniu constant al lanțului, cum ar fi de pildă  $C_{\mu1}, C_{\mu2}$  etc. (fig. 162). Deci, domeniul  $V$  al

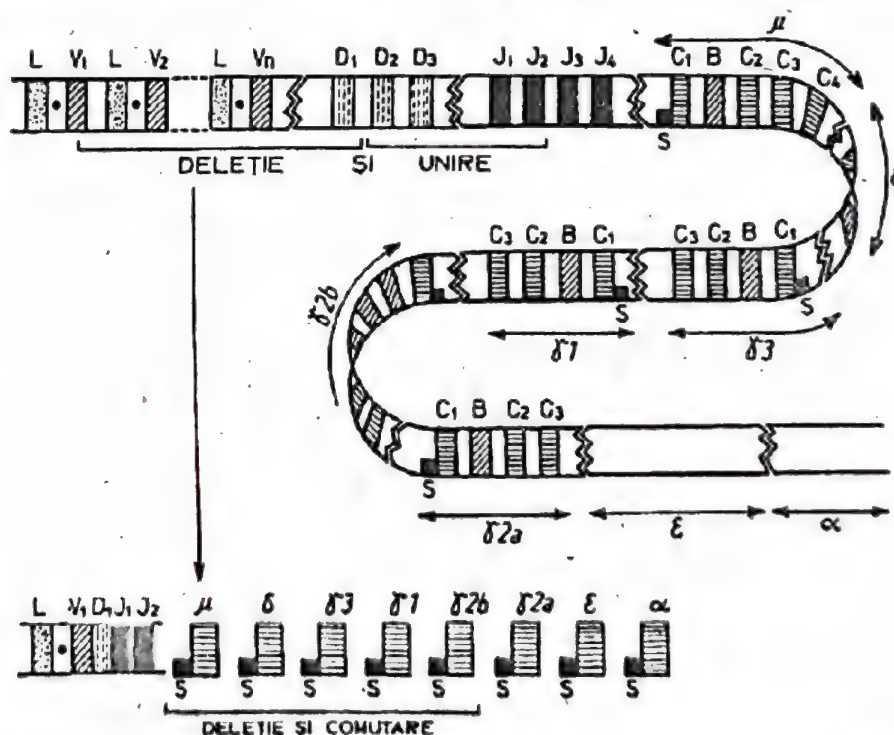


Fig.162. Sinteza lanțului H este controlată de către un număr mare de gene  $V$ , patru gene  $J$  și 20 de gene  $D$  care codifică pentru lanțuri cu diferite specificități de recunoaștere. Și numărul genelor care codifică pentru domeniile constante ( $C$ ) ale lanțului este mai mare (după O.G. Bier și col.).



lanțurilor  $H$  este creat prin unirea combinatorială a trei tipuri de gene ( $V$ ,  $D$ ,  $J$ ), fapt care permite o mai mare variabilitate  $V$  a lanțului  $H$  în comparație cu  $V$  a lanțului  $L$ . Același complex genic  $VDJ$  poate fi exprimat în comuniune cu orice grup de gene din regiunea  $C$  a lanțului  $H$ . Genele  $J$  sunt situate în vecinătatea imediată a genelor  $\mu$ , astfel încât complexul de gene  $VDJ$  este asamblat mai întâi cu  $C\mu$ . Așa se explică de ce primii anticorpi și primii receptori de membrană care apar aparțin clasei IgM. Ca și în cazul genelor care codifică pentru lanțul  $L\lambda$  sau  $L_k$ , în genomul liniei germinative genele  $VDJ$  sunt îndepărtate unele de altele. În cursul maturării limfocitului, genele  $V$  și  $D$  se apropie de una din genele  $J$  cu excizia celorlalte  $J$ , formând complexul  $VDJ$  care, inițial, va fi exprimat cu genele  $\mu$  și  $\delta$ , pentru ca ulterior să poată fi translocat în așa fel încât să se lege lângă oricare altă genă  $C$ , conducând la exprimarea lanțului  $H$  respectiv ( $VDJ_\gamma$ ,  $VDJ_\epsilon$ ,  $VDJ_\alpha$ ).

Din aceste date rezultă că asamblarea aminoacizilor și înșiruirea lor în lanțul polipeptidic începe dinspre extremitatea  $NH_2$  terminală către extremitatea  $COOH$  terminală a acestuia.

Genele lanțului  $H$  și  $L$  au două regiuni importante din punct de vedere funcțional: una este regiunea "de promovare" (promotor) sau de "inițiere" care inițiază transcrierea, iar alta este de "amplificare" (enhancer) localizată în intronul  $J-C$  și care intră în funcție numai după rearanjarea  $VDJ$ , ca urmare a reducerii distanței dintre promotor și amplificator. Promotorul conține octamerul  $ATGGAAAT$  asociat cu ARN nuclear iar amplificatorul, prezent numai pe limfocitele  $B$  mature, este un factor nuclear denumit NF -  $kB$  care se leagă la secvența  $GGGACTTTCC$  de la nivelul diferitelor gene, care nu aparțin numai limfocitelor  $B$  dar și unor virusuri (HIV, SV<sub>40</sub>) sau chiar și genelor care controlează sinteza antigenelor MHC de clasa I. NF -  $kB$  este controlat și reglat de către un factor citoplasmatic care-l recunoaște și-i inhibă activitatea. Rearanjarea segmentelor genice ale imunoglobulinelor trebuie să aibă loc înaintea transcrierii pentru asamblarea unității funcționale  $VDJ$ , fiind necesare și pentru efectuarea comutării clasei. Exprimarea unei rearanjări genice  $\mu$  induce rearanjarea ulterioară a genei  $V_H$ , fiind clar că exprimarea formei membranare a lanțului  $\mu$  este un moment critic pentru activarea aranjamentelor genei  $L_k$  și finisarea rearanjării ulterioare ale  $V_H$  (fig. 163). Regiunea de comutare ( $S$ , dintre exoni, neredată în text) este mediată de o "recombinază" care nu este specifică pentru  $B$  și care ar fi sub controlul unor factori necunoscuți, printre care și o limfokină elaborată de către limfocitul  $T$ .

De altfel, în recombinația  $VDJ$  sunt implicate "recombinazele  $VDJ$ ". Au fost identificate două gene care, atunci când se exprimă simultan, pot genera "activitatea recombinazică  $VDJ$ " la toate tipurile de celule, nu numai la cele ale sistemului imun. Aceste gene, care codifică pentru recombinaza  $VDJ$ , sunt "gene de activare a recombinazei" (RAG1 și RAG2 = recombinase activation genes).

**Asamblarea moleculelor de imunoglobulină.** Lanțurile  $H$  și  $L$  sunt sintetizate la nivelul ribozomilor din plasmocite, mărimea acestora fiind direct proporțională cu lungimea lanțului sintetizat. De exemplu, lanțurile  $H$  sunt sintetizate în cca. 75 de secunde de către poliribozomi formați din 16 - 18 unități ribozomale, iar lanțurile  $L$ , în cca. 30 de secunde, de către poliribozomi formați din 7 - 8 unități. Un plasmocit eliberează cca. 1 000 de molecule de anticorpi într-o secundă, o moleculă de imunoglobulină fiind sintetizată și asamblată în cca. 2 minunte. Sunt două modalități diferite de asamblare a lanțurilor în molecule, specifice diferitelor clase de imunoglobulină: fie că inițial se leagă între ele ambele lanțuri  $H$ , după care se atașează succesiv lanțurile  $L$ , fie că se leagă câte un lanț  $L$  la lanțul  $H$ , după care



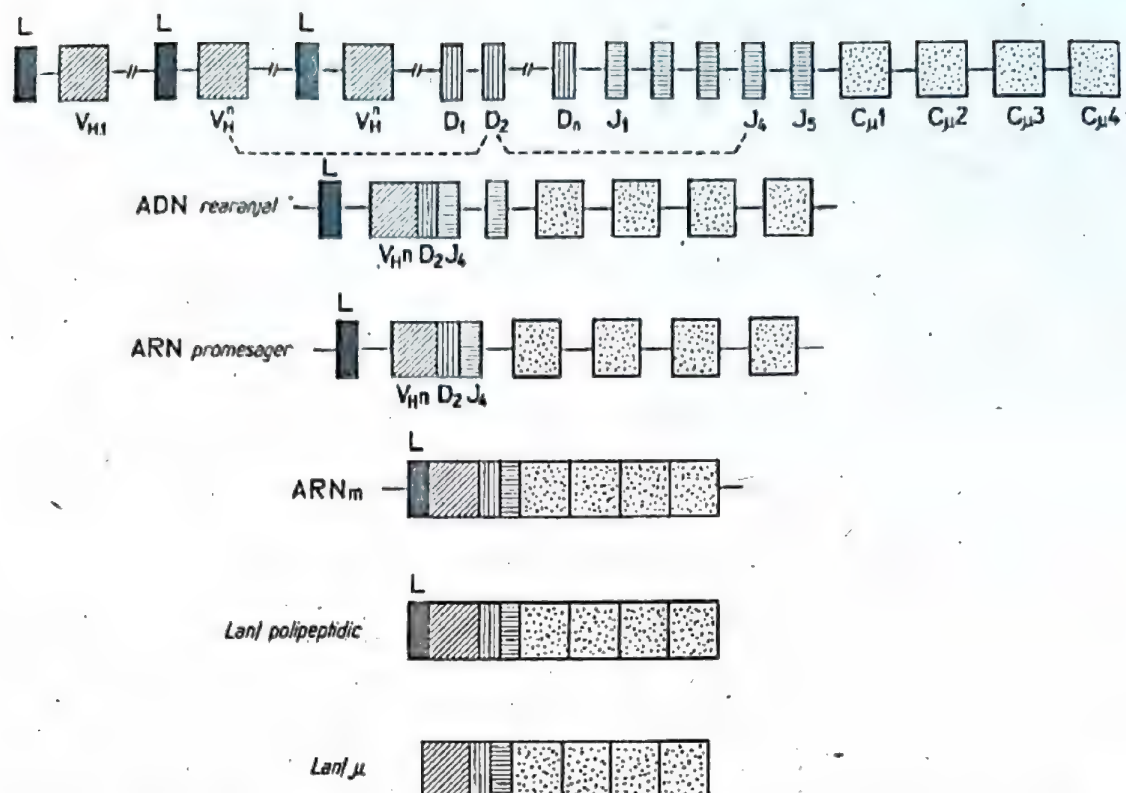


Fig.163. Transcrierea ansamblului  $V_H - D - J_H - C_H$  și maturarea ARNm. Un segment D se unește cu unul J, după care o genă  $V_H$  cu secvența L suferă un rearanjament, unindu-se cu ansamblul DJ, formând VDJ. Acesta este transcris într-un ARN promesager. Secvențele ARN care corespund intronilor și exonilor neutilizați sunt excizate, iar cele care codifică sunt unite formând un ARNm matur, tradus într-un lanț polipeptidic, care după ce ajunge în reticulul endoplasmic își pierde peptida semnal (L) (după M.P. Lefranc și G. Lefranc).

cele două jumătăți de molecule se assemblează prin legături disulfidice între lanțurile H (fig. 164):

Prima modalitate este specifică clasei IgM și unor subclase de IgG, iar cea de a doua modalitate, specifică clasei IgA și altor subclase de IgG. Asamblarea moleculei se face în cisternele ergastoplasmice (reticulul endoplasmic) și nu la nivelul ribozomilor, întotdeauna existând un ușor exces de lanțuri L. Dacă pentru sinteza unei molecule de imunoglobulină sunt necesare 2 minute, pentru secreția ei este nevoie de cca. 20 de minute, în această perioadă de "lag" realizându-se parcurgerea distanței de la ribozomi până la membrană, adăugarea glucidelor, polimerizarea moleculei etc. După eliberarea lanțurilor de pe poliribozomi și formarea moleculei, imunoglobulinele sunt transportate în lumenul reticulului endoplasmic și de acolo în complexul Golgi, unde se prind de membrană prin intermediul Fc. Glicoziltransferazele controlează atașarea glucidelor la moleculă, după care are loc un proces de exocitoză (o pinocitoză inversă), prin care veziculele își varsă conținutul în spațiul extracelular, conținut care, fie că ajunge în mediul exterior, fie că rămâne atașat la exteriorul membranei limfocitului sub formă de receptori. Între moleculele secretate și cele care rămân atașate la membrană sunt diferențe de structură a lanțului H, generate de intervenția a două tipuri diferite de ARNm. Tipul implicat în sinteza moleculelor atașate este ceva mai lung, astfel că lanțul H are un număr mai mare de aminoacizi decât numărul de aminoacizi în lanțul H al moleculei, care este eliberat în mediu. De exemplu,

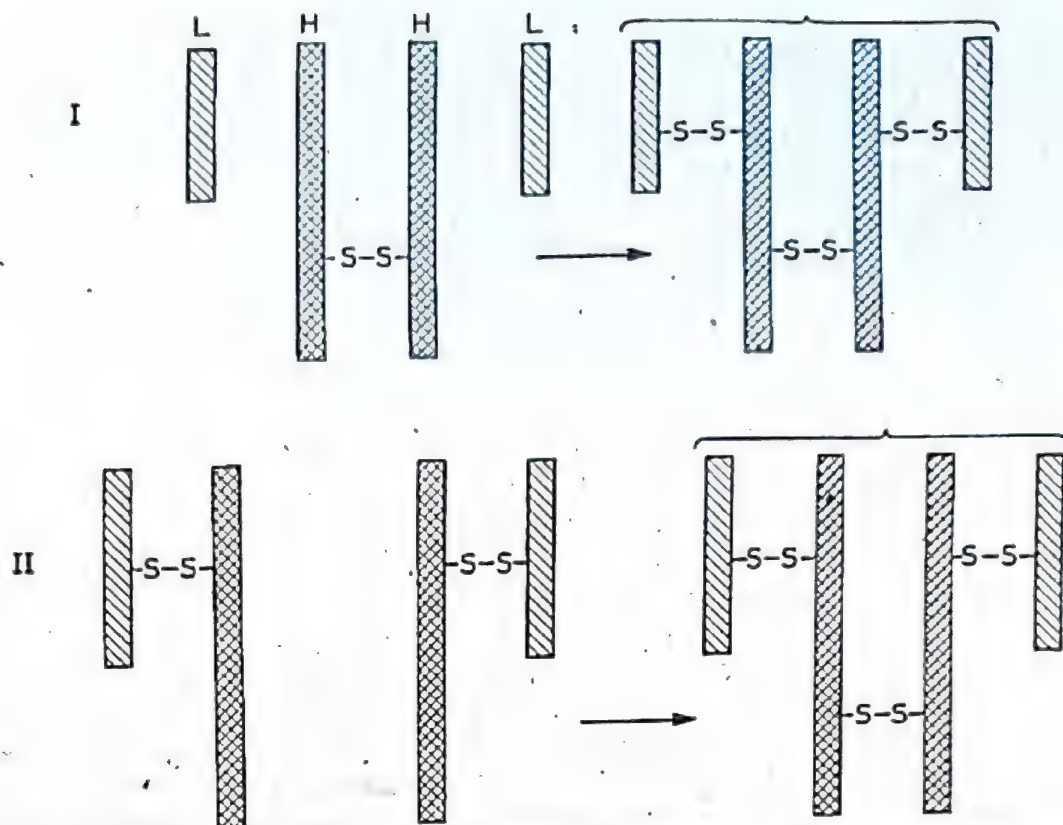


Fig.164. Două modalități diferite de asamblare a lanțurilor L și H. În varianta I, se leagă inițial lanțurile H, la care aderă ulterior lanțurile L.

În varianta II, se stabilesc legături -S-S- între un lanț L și unul H, după care se stabilesc legături H-H care unesc cele două jumătăți de moleculă.

lanțul  $\mu$  al moleculei de IgM secretată are o porțiune C terminală cu 20 de reziduuri de aminoacizi hidrofobi la care este atașat un grup glucidic, pe când cel al moleculei atașate are 41 de aminoacizi hidrofobi implantați ca o ancoră în dublul strat lipidic al membranei.

Aceste două regiuni sunt codificate de segmente diferite de ADN, denumite  $\mu_s$  în cazul imunoglobulinelor secretate și  $\mu_m$  în cazul celor ancorate la membrana celulară (fig. 165). Segmentul  $\mu_m$  este alcătuit din doi exoni,  $\mu_m 1$ , care codifică pentru 39 de aminoacizi, și  $\mu_m 2$  pentru 2 aminoacizi, toți cei 41 de aminoacizi formând dispozitivul de ancorare a lanțului  $\mu$  în membrana plasmatică. De fapt, numai 28 de aminoacizi sunt implantați în celulă (3 în citoplasmă și 25 transmembranar), restul de 13 fiind extracelulari.

Un limfocit B are ambii precursori mRNA,  $\mu_s$ ARN și  $\mu_m$ ARN, pentru imunoglobuline secretate și de membrană.

**Adiția componentelor glucidice** se face prin intermediul glicoziltransferazelor care controlează legarea covalentă a acestora la resturile de asparagină situate în diferite puncte ale lanțului H. Ordinea de adiție ar fi următoarea: glucozamina

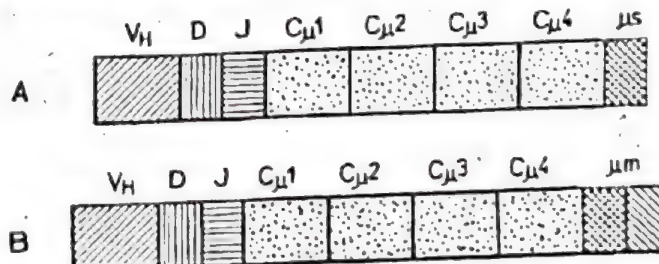


Fig.165. Segmentele ADN care codifică pentru lanțul  $\mu$  al IgM secretat (A) și pentru lanțul  $\mu$  al IgM ancorat în membrana plasmatică (B).



(GlcN), manoză (Man), galactoză (Gal), glucoză (Glc) și, la urmă, acidul sialic. Adiția acestor hexoze se face în compartimente diferite ale celulei, GlcN, după unii, atașându-se la lanțurile *H* aflate încă la nivelul ribozomilor (posibilitate neadmisă unanim), Man în cisternele ergastoplasmice, Glc la nivelul veziculelor Golgi, imediat după desprinderea lanțurilor de pe poliribozomi, iar fructoza și acidul sialic, aproape de momentul secreției. De regulă, adiția glucidelor la reziduul asparaginei se realizează prin legături N-glucozidice.

**Polimerizarea monomerilor** are loc în ultima fază, respectiv în timpul traversării membranei celulare, intracelular negăsindu-se polimeri, ci numai forma 7S. Deci, expulzarea și polimerizarea sunt evenimente simultane care implică prezența unor enzime și a lanțului *J* a cărui sinteză are loc atât în celulele *B*-activate, cât și în cele neactivate. În limfocitele activate, sinteza este mult mai activă, o celulă producând cca.  $10^6$  lanțuri, pe când limfocitele *B* neactivate produc doar cca.  $10^3$  lanțuri. Limfocitele *B* neactivate sintetizează acest lanț indiferent dacă la nivelul lor are sau nu are loc polimerizarea imunoglobulinelor. Dacă nu are loc polimerizarea, lanțul produs este degradat intracelular, întregul proces fiind probabil o reminiscență filogenetică, o amintire a vremilor trecute, când celula sintetiza imunoglobulina care ajungea în circulație numai sub formă de polimeri. Indiferent de mărimea polimerilor, raportul dintre acesta și lanțul *J* este de 1/1, concentrația de lanțuri *J* controlând compoziția polimerilor formați. De exemplu, în cazul moleculei de IgM există un raport optim între monomerii IgM și lanțul *J*, nici una dintre cele două componente nefiind în exces. Polimerizarea monomerilor implică integrarea mai multor evenimente biochimice diferite, primul dintre ele fiind acela de formare a dimerilor prin atașarea lanțului *J*. În cazul IgM, polimerizarea ulterioară este realizată prin interacțiuni necovalente între formele dimer și subunitățile monomer, interacțiuni care se blochează în momentul formării pentamerului.

Dar cum se poate explica existența în afara celulei a unor molecule aparținând aceleiași clase de imunoglobulină, care au diferite grade de polimerizare, cum este cazul celor de IgA? De ce în cazul IgA există molecule monomer, dimer, trimer, iar cele de IgM sunt numai sub formă de monomer sau pentamer?

Se pare că ar fi două fenomene care decid asupra gradului de polimerizare, și anume: viteza de expulzie a moleculei din celulă și modul de atașare a lanțului *J*. Dacă sinteza și eliminarea se fac rapid, respectiv dacă trecerea prin aparatul Golgi spre exterior este accelerată, molecula rămâne monomer. Dacă eliminarea este lentă, polimerizează. De asemenea, în cazul moleculelor de IgM, sinteza lanțului *J* este astfel balansată încât producerea acestuia nu este nici în minus nici în exces. În cazul moleculelor IgA, poate fi un deficit sau un exces de lanț *J*, din care cauză se vor forma polimeri, o formă de "economisire" și de folosire intensă a lanțului, sau "dimeri", o formă mai puțin "economică".

**Comutarea sintezei moleculelor de imunoglobuline.** Dacă un animal este stimulat antigenic, după prima inoculare în serul lui vor apărea anticorpi din clasa IgM cu specificitate pentru antigenul respectiv. După inoculări ulterioare, anticorpii, deși vor recunoaște același antigen, vor aparține altor clase de imunoglobuline, ca de pildă claselor IgG, IgA etc. Procesul care asigură variația claselor de imunoglobulină cu menținerea specificității lor funcționale, respectiv asamblarea la același situs combinativ  $V_H + V_L$  a diferite regiuni  $C_H$ , se numește "comutare".

Altfel spus, comutarea este procesul prin care se schimbă regiunea constantă a lanțului greu menținându-se cea variabilă, adică specificitatea de anticorp. Comutarea claselor de imunoglobulină are loc în orice moment al proliferării limfocitelor *B*, dar în special în două momente ale acestei proliferări: a) în momentul



maturării limfocitelor  $B$  și apariției celulelor imunocompetente și "virgine", când are loc comutarea de la  $IgM^-$ ,  $IgD^-$  spre  $IgM^+$ ,  $IgD^+$  și b) după activarea celulei de către stimulul antigenic, când are loc comutarea de la  $IgM$  la  $IgG$ ,  $IgA$  sau  $IgE$ .

După generarea genei funcționale  $V_H D H J_H$ , prima genă pentru segmentul  $C$  adițională este  $C_\mu$ . În măduva osoasă și ficatul fetal, celulele pre- $B$  exprimă  $C_\mu$ , dar nu și lanțurile  $L$ . După asamblarea genelor  $V_L J_L$  apar pe suprafața celulei molecule  $IgM$  cu funcții de receptor pentru antigen, după care are loc exprimarea  $C_\mu$  și  $C_\delta$  care leagă aceleași gene  $V_H D H J_H$  ca urmare a combinațiilor terminației diferențiale și a transcrierii  $V_H D H J_H + C_\mu$  sau  $C_\delta$ . În acest fel se realizează comutări  $IgM/IgD$  pe celule  $B$  naive aflate în  $G_0$  care pot fi de acum stimulate și care, după stimulare, proliferază și se diferențiază în plasmocite sau celule de memorie. La acestea vor avea loc, cu o mare frecvență, comutări în exprimarea genelor  $C_\gamma$ ,  $C_\epsilon$  sau  $C_\alpha$ .

Comutarea recunoaște mecanisme genetice de deleție sau transcriere, la același segment de gene  $VDH$ , a diferite gene  $C$ . În cursul răspunsului imun primar, la segmentul  $VDH$  care codifică pentru regiunea variabilă a moleculei, deci pentru specificitatea ei idiotipică, este transcrisă gena care va conferi caracterul de clasă  $IgM$  moleculei. În timpul maturării răspunsului, are loc activarea unor mecanisme mutaționale care determină deleția genei și transcrierea la același segment  $VDJ$  a altor gene. Cu alte cuvinte, ansamblul rearanjat  $V_H - D - J_H$  asociat prealabil la gena  $C_H$  poate fi asociat ulterior oricărui segment  $C$ . Aceste recombinări sunt posibile datorită existenței la toate genele  $C_H$  (în afară de  $C_\delta$ ) a unor frecvențe particulare care participă la mecanismele de comutare, din care cauză se numesc "secvențele  $S$ " (de la switch = a comuta). Există recombinaze specifice care recunosc secvențele  $S$  corespunzătoare claselor și subclasselor de imunoglobulină (fig. 166). Comutarea clasei realizată grație regiunii  $S$  antrenează deleția genelor  $C_H$  situate între complexul  $VDJ$  și gena  $C$  activă, favorizând formarea "buclelor de deleție" și eliminarea ulterioară a lor. Astfel, precursorii stimulării antigenice pot fi molecule cu aceeași specificitate de anticorpi dar care aparțin la clase diferite.

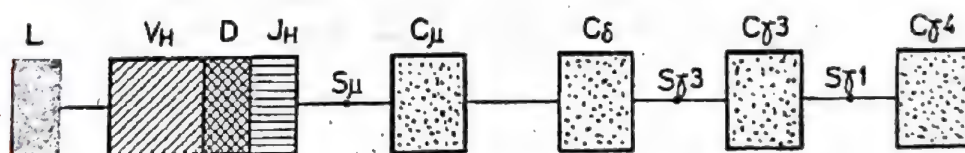


Fig.166. Secvențele  $S$  (de comutare) la nivelul genelor  $C$ .

## CONTROLUL GENETIC AL RECEPTORILOR PENTRU ANTIGEN DE LA NIVELUL LIMFOCITELOR $T$

Receptorul pentru antigen al acestei clase de limfocite este un complex molecular format din lanțuri polipeptidice care participă la recunoașterea antigenelor, la adeziunea celulelor, la transmiterea intracelulară a semnalelor etc. De aceea, controlul genetic al acestor receptori include toate genele care intervin în sinteza tuturor acestor lanțuri. De regulă, însă, sunt luate în considerare genele care codifică pentru lanțurile  $\alpha\beta$  sau  $\gamma\delta$ , deoarece acestora le revine misiunea recunoașterii specifice a epitopilor, fiind din acest punct de vedere similare lanțurilor  $L$  și  $H$  ale moleculelor de imunoglobulină. De altfel, și genele care codifică



pentru polipeptidele  $\alpha\beta$  sau  $\gamma\delta$  au o mare omologie structurală cu genele imunoglobulinelor. Aceste polipeptide pot fi divizate în 7 regiuni: o regiune a leaderului hidrofobic formată din 17 - 22 reziduuri de aminoacizi, un segment variabil V cu 88 - 98 de aminoacizi, un segment de unire J aflat încă extracelular cu cca. 14 - 21 reziduuri, o secvență de 87 - 113 aminoacizi similară regiunii constante C a imunoglobulinei; o peptidă de unire cu lungimea variabilă, o regiune transmembranară de cca. 20 - 24 de aminoacizi și o regiune citoplasmatică mică de 5 - 12 aminoacizi. Segmentele V și J formează regiunea V lungă de cca. 110 aminoacizi și similară regiunilor V ale imuno-globulinelor. Ca și la imunoglobuline, sinteza lanțurilor  $\alpha\beta$  sau  $\gamma\delta$  este controlată de către gene V pentru regiunile variabile și gene C pentru cele constante, unite de gene J și D. Vor fi deci  $V\alpha$ ,  $J\alpha$ ,  $C\alpha$  etc.

Locii pentru genele  $\alpha$  se găsesc atât la om cât și la șoarece, pe cromozomul 14, pentru  $\beta$  pe cromozomul 7 la om și 6 la șoarece, iar pentru  $\gamma$ , pe cromozomul 7 la om și 13 la șoarece. Pentru lanțurile  $\gamma\delta\epsilon$  din componenta CD3, genele sunt pe brațul lung al cromozomului 11, iar pentru lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$  ale CD8, pe cromozomul 2. Genele care codifică pentru celelalte segmente ale lanțurilor se găsesc pe aceiași cromozomi ca și cele ale regiunilor V. În total sunt patru grupe de gene care codifică pentru receptorul pentru antigen al celulelor T: genele  $\alpha$  și  $\beta$  exprimate pe majoritatea limfocitelor T, și  $\gamma$  și  $\delta$ , exprimate pe o populație minoră din timus sau periferie. Domeniile V variabile și C constante sunt codificate de exoni separați, un exon al domeniului V rearanjându-se într-o combinație particulară cu segmentele genelor D (diversitate) și J (unire) în cazul genelor  $\beta$  și  $\delta$ , sau cu segmentul genelor V și J în cazul celor  $\alpha$  și  $\gamma$ .

Lanțul  $\alpha$  este codificat de către gene  $\alpha$  care constă din cel puțin 100 de segmente  $V\alpha$  separate, iar gena  $C\alpha$  este unită de  $V\alpha$  prin cel puțin 50 de segmente posibile de unire J. Familia  $\alpha$ , atât la om cât și la șoarece, nu are segmentul de diversitate D.

Enorma diversitate a moleculelor receptorilor care trebuie să recunoască o largă varietate de antigene este generată de deleția sau adiția nucleotizilor de la joncțiunea VJ, numărul total la combinațiile posibile fiind  $100 V \cdot 50 J = 5\,000$ . Deci, este o diversificare generată de procese de aranjare genică.

Lanțul  $\beta$  are cca. 14 subfamilii cu câte 20 - 30 de segmente de gene. Este asemănător familiei de gene  $V_H$  a imunoglobulinelor, pe când  $V\alpha$  a receptorului pentru antigen al limfocitelor T este similară cu  $V_k$  imunoglobulinic. Diversitatea secvenței aminoacizilor în lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$  ale receptorilor pentru antigen pe limfocitul T este mai mare decât la familia de gene V a imunoglobulinelor. De altfel, segmentele V ale lanțurilor  $\alpha$  și  $\beta$  pot fi total diferite din punct de vedere al secvenței aminoacizilor în lanț, chiar și atunci când aparțin aceleiași familii. Mai mult, secvențele controlate de genele de unire J sunt diferite ca număr:  $J\alpha$  are 19 - 21 de codoni, iar  $J\beta$  are doar 15 - 17 codoni.

Lanțul  $\beta$  are și gene D, la șoarece fiind identificate  $D\beta 1$  și  $D\beta 2$ . Și regiunea constantă C are un  $C\beta 1$  și  $C\beta 2$  fără deosebire funcțională între ele. Fiecare  $C\beta$  are 8 exoni care codifică pentru: a) domeniul regiunii constante; b) aminoacizii care realizează dubbele legături sulfidice interlanț; c) domeniul transmembranar și d) domeniul citoplasmatic.

Lanțul  $\gamma$  are 14 gene V dintre care 6 sunt pseudogene, cinci gene J și două C ( $C\gamma 1$  și  $C\gamma 2$ ) dar, ca și lanțul  $\alpha$ , este lipsit de genele de diversitate D (fig. 167). Lanțul  $\delta$  are mai multe regiuni V, două J, două D și una C cu 8 exoni. Este situat între segmentele  $V\alpha$  și  $J\alpha$ . Existența sau inexistența genelor de diversitate D, atât la lanțurile imunoglobulinice cât și la cele polipeptidice ale receptorului pentru antigen de pe limfocitul T, stă la baza rearanjărilor fie VJ, fie VDJ (tabelul 95).

Segmente în genele receptorului T pentru antigen la șoarece  
(după R. A. Hubbard și J.J. Marchalonis)

Segmentul	Lanțul			
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
V	100	50	9	3
D	-	2	-	2
J	50	6	2	2
C	1	2	2	1

Lanțul imunoglobulinic ușor L și lanțurile  $\alpha$  și  $\gamma$  ale receptorului pentru antigen T au rearanjări VJ, lanțurile grele H,  $\beta$  și  $\delta$  au rearanjări VDJ care încep cu unirea DJ la care are loc adăugarea V formându-se complexul VDJ și, în final, adăugarea C cu formarea complexului VDJC. Există asocieri "preferențiale" predominante ca, de pildă,  $V_\gamma 2 + J_\gamma L + C_\gamma 1$ . Trei modalități principale generează diversitatea acestor proteine: a) diversitatea joncțională; b) unirea și asocierea combinatorială și c) mutații somatice.

Diversitatea joncțională începe cu variabilitatea în lungimea regiunilor VDJ încorporată în gena finală și adăugarea de secvențe nemoștenite în linia germinativă.

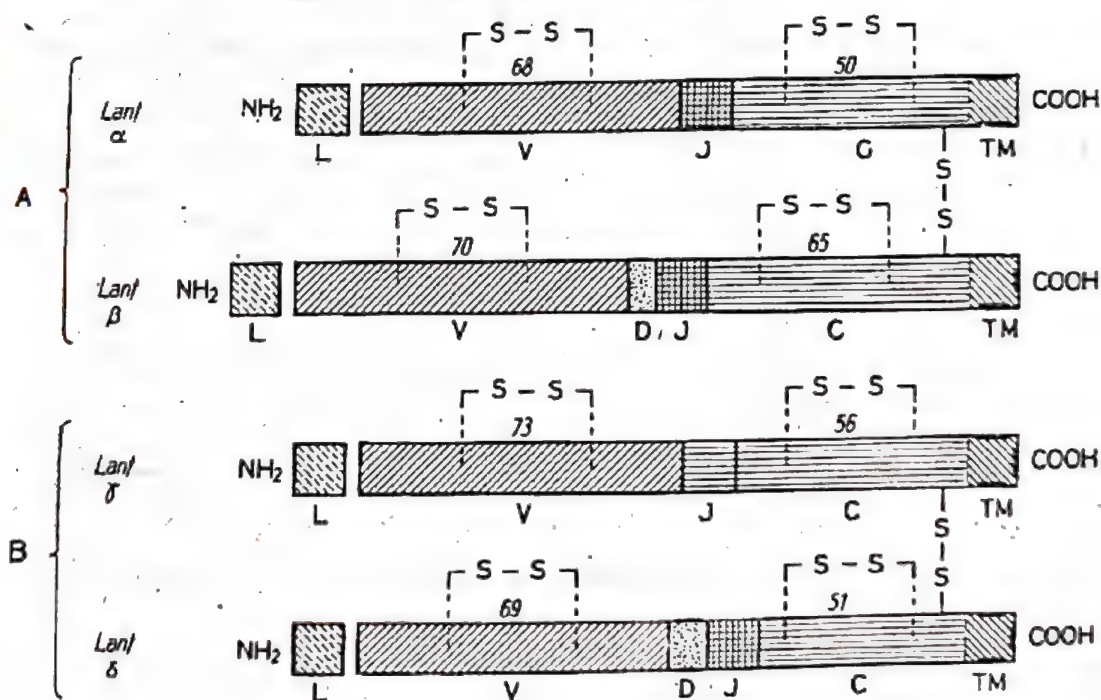


Fig.167. Reprezentarea schematică a segmentelor lanțurilor  $\alpha\beta$  și  $\gamma\delta$  ale receptorului pentru antigen de pe celulele T, controlate de către gene diferite.

A= $\alpha\beta$ ; B= $\gamma\delta$ ; L=Leader; V,D,J,C=regiunile variabile, de diversitate, de unire sau constante ale lanțurilor; TM=segment membranar; C=reziduuri de cisteină care realizează dubbele legături disulfidice -S-S-. Cifrele arată numărul reziduurilor de aminoacizi (după S.M.H.).



Unirea și asociațiile combinatoriale sunt un amestec aleatoriu între regiunile V și J sau VDJ. De exemplu,  $100 V_{\alpha} \cdot 50 J_{\alpha} = 5\,000 V_{\alpha}J_{\alpha}$ ;  $60 V_{\beta} \cdot 2 D_{\beta} \cdot 6 J_{\beta} = 1\,560 VDJ_{\beta}$ ;  $6V_{\delta} \cdot 2D_{\delta} \cdot 2J_{\delta} = 24 VDJ_{\delta}$ . Deci lanțul  $\alpha$  are cel mai mare potențial de diversitate, deși este lipsit de genele D.

Prin asociații combinatoriale  $\alpha\beta$  sau  $\gamma\delta$ , diversitatea se amplifică enorm:  $5\,000\alpha \cdot 1\,560\beta = \text{cca. } 8 \cdot 10^6$  heterodimeri (la șoarece). Acest număr poate fi multiplicat prin diversitatea joncțională, fapt care face ca potențial, diversitatea de recunoaștere să fie enormă. De exemplu, la receptorul  $\gamma\delta$  numărul combinațiilor este de cca. 500, dar enorma diversitate a regiunii de unire face ca repertoriul de recunoaștere să fie de cca.  $10^{13}$ , poate și datorită faptului că gena  $\delta$  este localizată în linia germinativă, în mijlocul locusului  $\alpha$  (fig. 168). Rata mare de mutații somatice

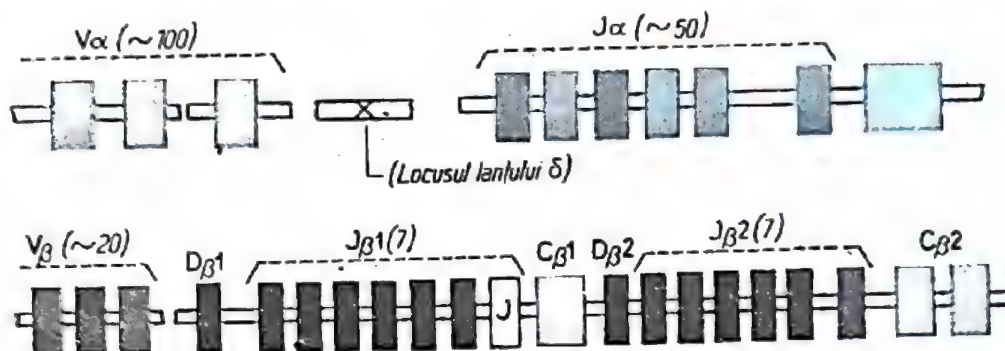


Fig.168. Genele receptorului  $\alpha\beta$  murin. Lanțul  $\delta$  are genele intercalate în șirul de gene  $\alpha$ . Fiecare set de gene  $J_{\beta}$  se termină cu o pseudogenă (după I. Roitt și col.).

la nivelul exonilor VDJ amplifică și mai mult acest potențial de diversificare. Unirea segmentelor în cursul rearanjărilor are loc probabil printr-un proces de excizie a unor secvențe și de fuziune a extremităților secvențelor liniare, consecutiv exciziei celor circulare (fig. 169). Studii referitoare la formarea secvențelor circulare ale

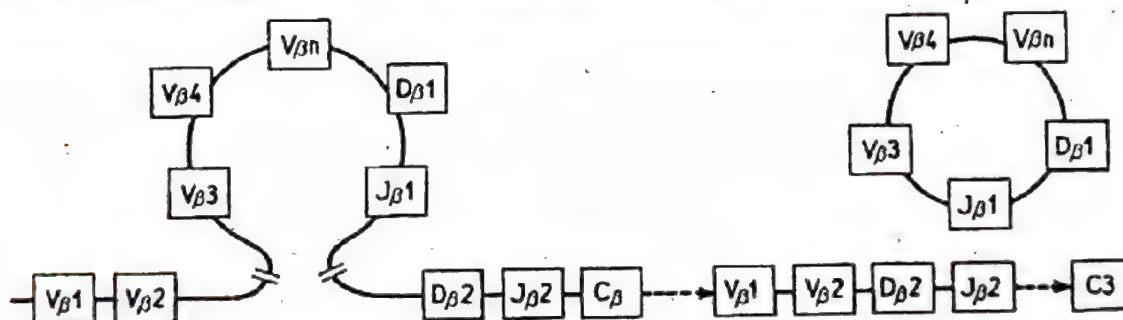


Fig.169. Reprezentarea schematică a modalităților de deleție prin excizie și fuziune a segmentelor liniare, cu formarea de segmente circulare de gene.

genelor  $\alpha$  ale receptorului pentru antigen al limfocitului T precum și ale genelor  $\delta$  au demonstrat existența următoarelor tipuri de rearanjări posibile la locusul  $\alpha/\delta$  al receptorului:

- unire  $D\delta1 - D\delta2$ ;
- rearanjări incomplete ale genei  $\delta$  ( $V - D\delta$ ) care sunt înlocuite de rearanjări  $V\delta J\delta$ ;
- eliminarea rearanjărilor  $V-D-D-J$ ,  $D\delta-J\delta$  sau  $J\delta-J\alpha$  nefuncționale;
- rearanjările  $V\alpha-J\alpha$  pot fi înlocuite de alte rearanjări  $V\alpha J\alpha$  mai eficiente.

Unirea capetelor segmentelor rezultate este uneori imprecisă, din care cauză au loc rearanjări nefuncționale care însă generează mari variații. Imprecizia este generată de deleții greșite ale segmentului sau de inserția unor nucleotide cu alte particularități decât cele care urmau să fie asamblate.

Intratimic, genele care codifică pentru regiunile V sunt asamblate sub controlul unei serii de "gene de rearanjare". De exemplu, la receptorul pentru antigen cu heterodimerul  $\alpha\beta$ , genele  $\beta$  sunt exprimate inițial prin asamblarea membrilor segmentelor de genă  $V\beta$ ,  $D\beta$  și  $J\beta$ , după care sunt asamblate segmentele genelor  $V\alpha$  și  $J\alpha$ . Regiunile V ale imunoglobulinelor, ale  $CD4/CD8$  și ale lanțurilor  $\alpha\beta$  sau  $\gamma\delta$  ale receptorului pentru antigen al limfocitului T sunt omoloage, dat fiind faptul că provin dintr-o genă ancestrală unică. Din această cauză, situsul combinativ al imunoglobulinei și al receptorului T au aceeași specificitate de recunoaștere (bineînțeles, dacă aparțin clonelor "predestinate" să recunoască un epitop comun). Mai mult, repertoriul de recunoaștere acumulat în cursul ontogeniei limfocitului T se realizează prin mecanisme similare celor folosite de celula B în producerea imunoglobulinelor. Pe lângă generarea unui larg repertoriu de recunoaștere, prin unirea combinatorială a segmentelor de gene care există în copii multiple în genom, sunt utilizate și alte mecanisme de diversificare a regiunii variabile: flexibilitatea joncțională, unirea imprecisă a segmentelor de gene, adăugarea în cursul procesului de rearanjări somatice la punctele de unire a unor nucleotide care nu există în genom etc.



## COOPERĂRI CELULARE ÎN RĂSPUNSUL IMUN

Un determinant antigenic care vine în contact cu sistemul imunitar declanșează un șir de reacții care vizează neutralizarea și eliminarea lui din intimitatea țesuturilor organismului agresat. Aceste reacții implică fie proliferarea clonelor de limfocite care au receptori specifici pentru determinantul respectiv, fie sinteza de anticorpi care-l pot recunoaște specific prin situsurile lor combinate. În primul caz, reacțiile imune sunt "medicate celulare", adică prin intervenția directă a celulelor efectoare, iar în cel de al doilea caz "medicate umoral", adică prin anticorpi.

Dar, pentru declanșarea acestor reacții este necesar ca celulele limfoide să primească semnale activatoare de la antigenele străine de organism, semnale care să le antreneze spre proliferare și/sau sinteză de citokine sau de imunoglobuline. Semnalul strict necesar pentru activarea proceselor metabolice ale celulei este furnizat de receptorul pentru antigen sau pentru lectine, după ce a recunoscut ligandul respectiv. El constituie "mesagerul primar" și se instalează consecutiv fixării ligandului la receptor, proces în urma căruia receptorii de la nivelul membranei plasmactice se "aglomerează", facilitând transmiterea de noi mesaje în interiorul celulei. Această "aglomereare" este realizată fie de către antigenele timo-independente care, datorită monotoniei repetitive a epitopilor de la nivelul moleculei interesează simultan un număr mare de receptori "focalizând" semnalele și amplificând potențialul mesager, fie de către antigenele timo-dependente care nu au unități repetitive. În cazul antigenelor timo-independente, stimulul nu solicită semnale auxiliare, pe când în cazul celor timo-dependente, care reprezintă cvasi-totalitatea antigenelor existente în natură, este necesară existența unor stimuli adiționali. Și într-un caz și în celălalt, activarea celulei și declanșarea răspunsului imunitar recunosc intervenția a trei grupe de mesageri: a) mesageri primari, adică antigenele sau liganzii care se fixează la receptori; b) mesageri secundari, reprezentați de evenimentele care se instalează după recunoașterea liganzilor de către receptori și care sunt exprimați ca reacții biochimice la nivel membrănar sau citoplasmic, implicând activarea unui complex de enzime și ioni, și c) mesageri terțiari, respectiv factori de transcriere nucleară implicați în producția și activarea unor citokine sau a altor factori de genul NF-KB, NF-IL6 etc.

În mod cert, simpla legare a agentului stimulant la receptorul de la nivelul membranei plasmactice este inoperantă, o celulă fiind imposibil de antrenat de către antigen din faza de repaus  $G_0$  spre fazele ulterioare de activare  $G_1$ , S și  $G_2$ . Pentru aceasta este nevoie de intervenția a cel puțin două semnale, unul principal sau semnalul I, lansat de către antigen sau lectine, și altul "secundar", sau semnalul II, lansat de LPS, endotoxine, citokine sau de diverse contacte intercelulare. Ca atare, sunt necesare mai multe tipuri de celule care, fie prin mesageri

moleculari reglatori (activatori, inhibitori etc.), fie prin contact direct, coordonează evoluția celei activate până la stadiul final de celulă efectoare (plasmocit, limfocit citotoxic) sau de memorie.

Schematic, pentru declanșarea cascadelor reacționale la nivelul limfocitelor, sunt implicate următoarele momente:

a) recunoașterea antigenului străin, captarea, prelucrarea și prezentarea lui într-o manieră accesibilă altor celule;

b) primirea informației despre natura antigenului și declanșarea cascadelor de reacții biochimice intracitoplasmice finalizate prin proliferare celulară și activarea sintezei proteinelor;

c) neutralizarea antigenului și activarea mecanismelor de control care vor readuce tot sistemul imun în stadiul inițial de "acalmie", dar cu un număr sporit de molecule de anticorp sau de celule de memorie gata oricând, la un nou contact cu același agresor, să dezvolte mult mai prompt și mult mai intens reacțiile de apărare imună.

Recunoașterea, prelucrarea și prezentarea antigenului este atributul funcțional al mai multor populații celulare denumite "celule antigen prezentatoare" sau APC (antigen-presenting cells) (tabelul 96). Acestea fie că-l internalizează prin fagocitoză sau pinocitoză și-l scindează în peptide imunogene pe care le prezintă limfocitelor în asociere cu moleculele MHC proprii de clasa I sau II, fie că îl rețin ca atare la nivelul membranei facilitând contactul acestora cu limfocitele care au receptori specifici pentru el. Din prima categorie fac parte macrofagele, iar din a doua, limfocitele B și celulele dendritice și, întrucâtva, limfocitele T.

Indiferent cărei clase aparțin, celulele APC trebuie să întrunească următoarele condiții: a) să exprime pe suprafața lor antigenele MHC de clasa II; b) să poată reține și eventual "prelucra" antigenul; c) să poată elibera unul sau mai multe semnale auxiliare către limfocitele T.

Tabelul 96

Diferite populații de celule APC (după Roitt și col.)

Linia celulară	Tipul de celulă	Localizare	Funcții fagocitare
Mieloidă (monocitar- macrofagică)	Monocite	Sânge	+
	Macrofage	Țesuturi	+
	Kupffer	Ficat	+
	Microglii	Creier	+
Celule APC nefagocitare	Langerhans	Piele	-
	Dendritice interdigitale	Țesuturi limfoide	-
	Dendritice foliculare	Țesuturi limfoide	-
Limfoidă	Limfocite B	Țesuturi limfoide	-
Facultativ APC	Astrocite	Creier	+
	Celule endoteliale	Vase	-
	Fibroblaste	Țesut conjunctiv	-



De regulă, antigenele corpusculare sunt fagocitate și scindate, iar cele moleculare sunt pinocitate sau pur și simplu reținute pe suprafața membranei celulelor APC, care au ca rol fiziologic atât prezentarea antigenului asociat cu moleculele MHC cât și generarea semnalului II.

Peptidele mici pot să nu fie recunoscute când sunt prezentate ca parte a unei molecule de proteină intactă. De aceea, ele trebuie să ajungă în interiorul celulelor fagocitate prin pinocitoză sau fagocitoză unde sunt degradate în peptide, care ulterior sunt asociate cu moleculele de clasa II MHC și prezentate limfocitelor. Endocitoza, adică internalizarea, poate fi realizată prin fagocitoză neimună sau prin opsonizare. În cazul fagocitozei, corpusculii ingerați sunt degradați la nivelul fagolizozomilor, epitopii fiind exprimați în vederea informării celulelor  $T$ . Și în cazul complexelor ligand-receptor sau ligand-anticorp, deci al endocitozei opsonice, are loc o deformare a membranei celulare, cu formarea unei depresiuni și apoi a unei vezicule prin care este internalizat materialul fagocitat.

Sunt următoarele momente, atât la celulele fagocitare cât și la cele nefagocitare, dar care-și internalizează receptorii: a) legarea proteinelor la receptori; b) internalizarea complexului ligand-receptor; c) desfacerea complexelor și degradarea ligandului; d) asocierea la moleculele MHC; e) exprimarea pe suprafața membranei celulare.

Membrana plasmatică a celulelor eukariote este căptușită cu o peliculă de molecule denumită "clathrin" care are rol în endocitoza hormonilor, proteinelor, virusurilor, toxinelor etc. După fixarea liganzilor se formează la nivelul membranei un fel de "depresiuni tapisate" cu clathrin care se închid sub formă de "vezicule tapisate" în care sunt liganzii și receptorii care i-au fixat (fig. 170).

"Veziculele tapisate" nu au capacitatea de discriminare, internalizând orice complex existent pe suprafața celulei, această capacitate revenind în exclusivitate receptorului. Soarta proteinei internalizate este diferită dar, de regulă, ea este eliberată către organite subcelulare specifice.

Complexele ajung în vezicule netapisate, cu pH acid, acidifierea fiind ATP-dependentă, unde sunt desfăcute în părțile lor componente, respectiv în receptori, care vor fi exprimați pe suprafața celulei, și în liganzi care vor fi degradați ca urmare a fuziunii veziculelor cu lizozomii. Materialul astfel prelucrat este proiectat pe suprafața celulei în asociere cu moleculele MHC de clasa II. De fapt, în afară de fagocitoză și degradare intracelulară, celulele APC pot reține și prezenta antigenul în diverse modalități: îl pot reține la suprafața membranei legându-l la receptori de natură imunoglobulinică, cum este cazul limfocitelor  $B$ , îl pot lega la receptori pentru  $Fc$  sau pentru complement atunci când circulă sub formă de complexe antigen-anticorp, sau poate fi pur și simplu reținut pentru un timp îndelungat de către celulele dendritice foliculare sau interdigitale. Acestea îl asociază probabil cu moleculele MHC care circulă liber în plasmă.

Există diferențe și în privința prelucrării și prezentării antigenelor de origine endogenă sau exogenă. Antigenele endogene, adică cele sintetizate endogen, ca de pildă proteinele virale produse în celulele infectate, se asociază ca fragmente de proteină la antigenele MHC de clasa I stimulând limfocitele  $TCR CD8^+$ . Peptidele acestora, imediat după sinteza lor în reticulul endoplasmic, leagă moleculele MHC formând un complex peptidă-MHC. Moleculele MHC de clasa I au un situs de legare a peptidelor pentru antigen care este în permanentă ocupat de către peptidele proprii, cele exogene, străine de organism, fiind nevoite să competiționeze cu cele endogene pentru a putea ocupa aceste situsuri. Când

peptidele proprii au fost dislocate de către cele străine, complexul antigen-moleculă MHC de clasa I este exprimat pe suprafața celulei și expus recunoașterii limfocitelor Tc ( $CD8^+$ ).

Antigenele exogene (proteine solubile, proteine virale etc.) sunt endocitate și degradate de către APC în endozom, după care interacționează cu moleculele MHC de clasa II, complexul format fiind transportat spre suprafața celulei și expus recunoașterii limfocitelor Th ( $CD4^+$ ). Acest complex asociază necovalent o moleculă de 31 kD lipsită de polimorfism, din care cauză este denumită "lanțul invariabil" (Li) care este prezent la toate tipurile de celule care exprimă MHC de clasa II. Acest lanț, codificat de o genă unică, există sub forme cu dimensiuni diferite: 31 kD, 33 kD 41 kD și 43 kD. El ar bloca "fosa" de legare a peptidei-antigen de la nivelul moleculelor MHC de clasa II până la endozom, unde se detașează favorizând legarea peptidelor de origine exogenă și mai puțin pe cele de origine endogenă. Aceste lanțuri sunt responsabile de transportul selectiv în cursul

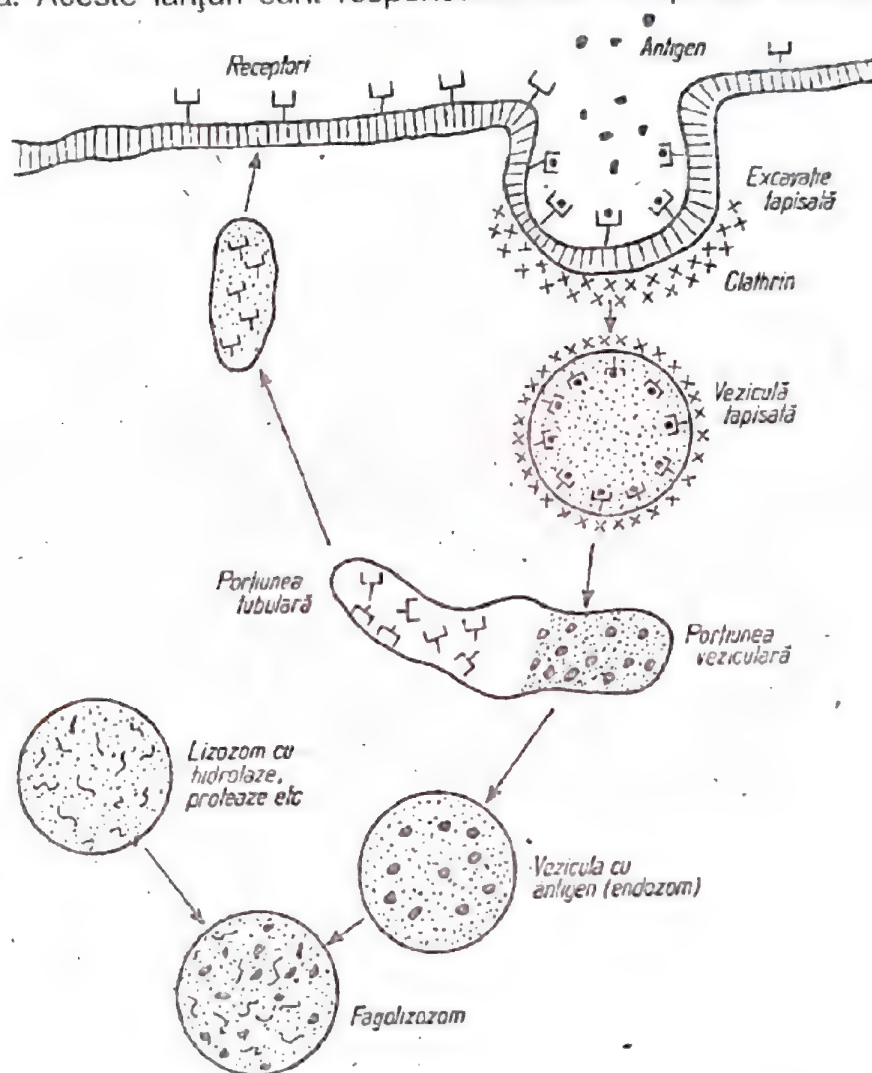


Fig.170. Prelucrarea antigenului în celula "prezentatoare de antigen" și reexprimarea receptorilor pe membrană. Receptorii de pe membrana plasmatică recunosc și leagă antigenul, formând o excavație căptușită de "clathrin" care se închide, formând o veziculă "tapisată" și apoi un endozom unde complexe antigen-anticorp sunt foarte numeroase. Endozomul se alungește sub formă de spirală, antigenul se desprinde de receptor polarizându-se la un pol iar receptorul la alt pol. Se formează două vezicule diferite, una cu receptorii liberi care vor emigra spre suprafață unde vor fi reexprimați, și alta care va fuziona cu lizozomii în vederea degradării materialului fagocitat.



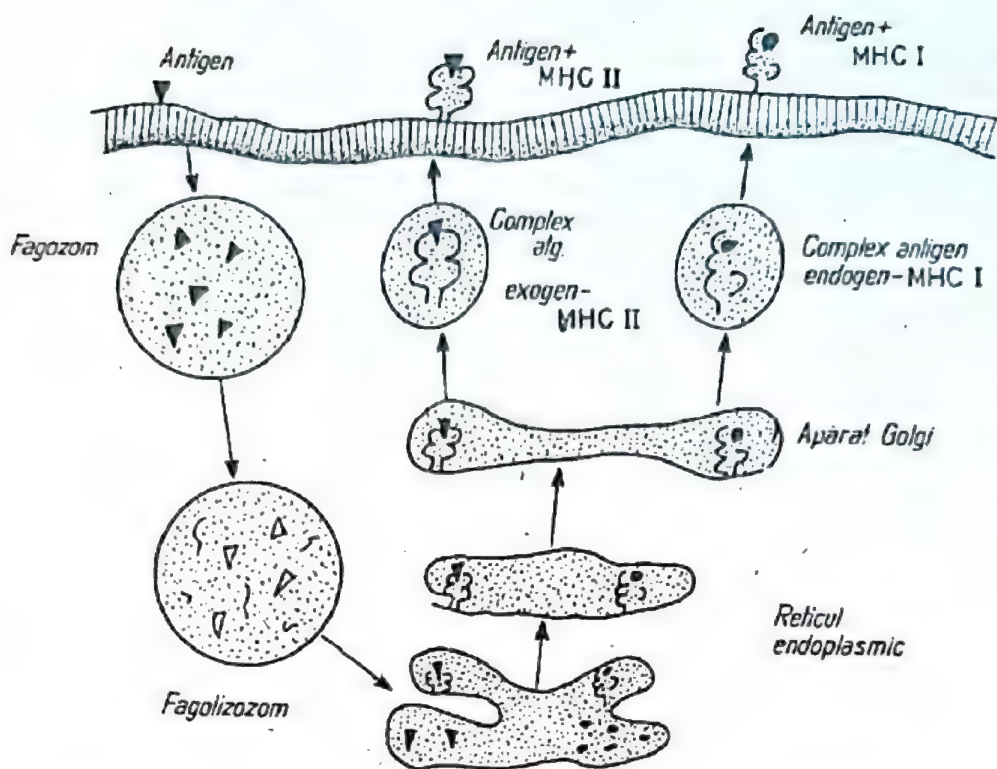


Fig.171. Model ipotetic de formare a complexelor peptidă-molecule MHC de clasa I și clasa II (după G.J. Hämmerling și J. Moreno).

traversării diferitelor compartimente celulare. De exemplu, lanțul de 31 kD dirijează moleculele MHC de la aparatul Golgi către endozom, iar forma de 33 kD generează un semnal de reținere a lor în reticulul endoplasmic. Imediat după sinteză, *Li* se asociază în reticulul endoplasmic cu lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$  ale moleculelor de clasa II, după care complexul este transportat în aparatul Golgi unde întâlnește antigenul exogen (fig. 171). Moleculele MHC leagă peptida antigenică, iar *Li* se disociază în timp ce peptida și molecula de MHC clasa II se deplasează spre suprafața celulei.

Există și o altă ipoteză privind rolul acestui lanț: ar bloca sau modifica depresiunea din heterodimerul  $\alpha\beta$  care leagă peptida, protejând în felul acesta moleculele de clasa II de asocierea la nivelul reticulului endoplasmic sau al aparatului Golgi cu peptidele endogene, care ar putea competiționa cu cele exogene. Pentru aceasta, după ce părăsesc aparatul Golgi ajung în endozomi, unde se asociază cu complexul antigen+MHC de clasa II facilitându-le exprimarea pe suprafața celulară.

La nivelul membranei, fragmentele de antigen legate la molecula de MHC formează un complex care va fi recunoscut de către receptorul limfocitului T. La majoritatea antigenelor, fragmentul stimulant, adică epitopul, este reprezentat de o peptidă scurtă, cu o secvență de 10 - 15 reziduuri de aminoacizi. Pentru ca antigenele să poată stimula limfocitele T, ele trebuie să fie "prelucrate" de către celulele APC. Pentru unele, este suficientă "despachetarea" moleculei care să permită accesul peptidei la MHC, pe când pentru altele este necesară clivarea enzimatică. Din acest punct de vedere sunt antigene de tip I, cum ar fi fibrinogenul, produsele *Listeriei monocytogenes* etc., care nu necesită prelucrare, de tip II (lizozim, mioglobină) care necesită desfacerea moleculei și prelucrarea ei, și de tip III (citocrom, ovalbumină, insulină) care necesită clivaj înainte de legare

Fig. 9). Deci nu întotdeauna este necesară clivarea antigenelor în peptide, unele fiind suficientă doar "despachetarea" lor. Peptidele proprii organismului, care sunt legate la molecula MHC de clasa I, nu sunt modificate, fapt care permite ipoteza existenței unei legări slabe, care poate fi ușor dislocată de peptidele nonproprii sau de cele proprii modificate. Peptidele susceptibile să se lege la o moleculă MHC diferă între ele în ce privește numărul de aminoacizi (8 - 10 reziduuri pentru cele care se leagă la antigenele MHC de clasa I și 13 - 17 pentru cele care se leagă la MHC de clasa II). Dar, indiferent de mărimea lor, ele trebuie să întrunească unele condiții, și anume: a) să se poată asocia la peptidele din "fosa" complexului MHC; b) să fie "amfipatice", adică să aibă o față hidrofobă care să vină în contact cu MHC și alta hidrofilă, accesibilă receptorului pentru antigen de pe limfocitul T.

Legarea peptidelor la moleculele MHC în vederea realizării "complexului de prezentare" se face așadar la nivelul unui "situs de legare", o scobitură adâncă, lată de cca. 10 Å și lungă de 25 Å, existentă la nivelul domeniilor  $\alpha_1$  și  $\alpha_2$  ale clasei de molecule MHC I, sau  $\alpha_1$  și  $\beta_1$  ale clasei MHC II unde intervine și lanțul Li care scoate moleculele din endozomi și le proiectează pe "fosa" de legare a peptidei antigen (fig. 172). Domeniile  $\alpha_1$  și  $\alpha_2$  formează un fel de platou, prin apropierea a 8 pliuri  $\beta$  antiparalele. În acest fel, se realizează o "fosă", un fel de pungă de dimensiunile menționate mai sus, la nivelul căreia se fixează peptide, care este susținută de un "picior" alcătuit din domeniul  $\alpha_3$  al lanțului  $\alpha$  și din  $\beta_2$ -microglobulina (fig. 173). În cazul moleculelor MHC de clasa I, la situsul format din domeniile amintite se leagă peptide ceva mai scurte. Moleculele MHC de clasa II leagă peptide mai lungi, care depășesc la extremitatea COOH terminală dimensiunile "fosei", fiind "șlefuite" de către o "carboxipeptidază" (fig. 174).

Secvența aminoacizilor la nivelul acestei scobituri face ca polimorfismul MHC să acționeze pe două fronturi: a) să modifice specificitatea peptidei antigenice și b) să modifice potențialul de legare a receptorului pentru antigen de pe limfocitul

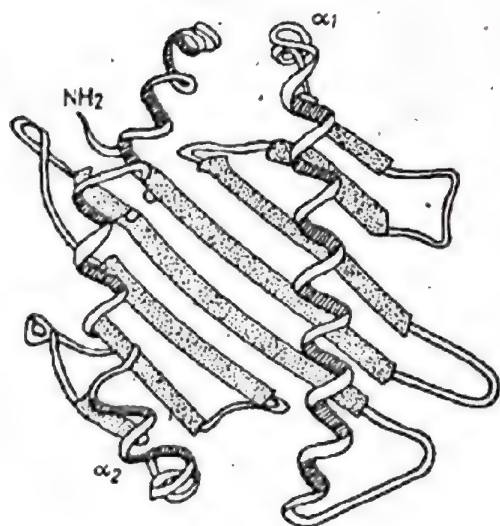


Fig. 172. Situsul de legare a peptidei antigen la nivelul moleculei MHC este un "platou" alcătuit din 8 pliuri  $\beta$  antiparalele mărginit de 5-helixuri ale domeniilor  $\alpha_1$  și  $\alpha_2$  ale lanțului  $\alpha$ .

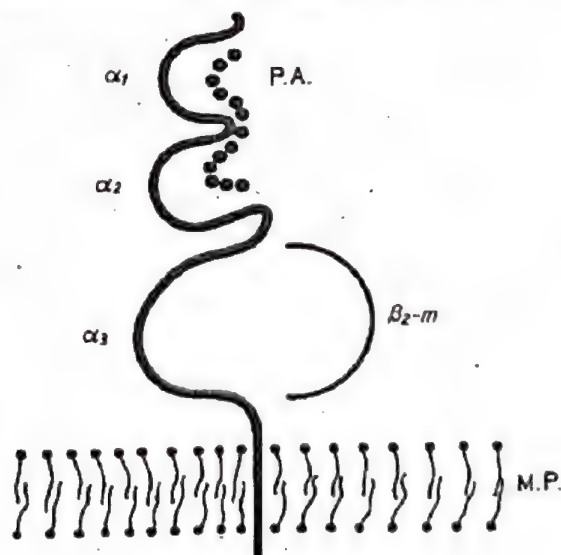


Fig. 173. Reprezentarea schematică a legării peptidei antigenice (PA) la situsul de legare. Domeniile  $\alpha_1$  și  $\alpha_2$  formează "capul" care fixează antigenul, iar  $\alpha_3$  și  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ -m) "piciorul" structurii, implantat în membrana plasmatică (M.P.).



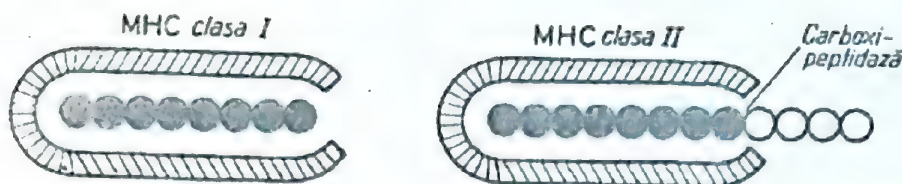


Fig. 174. Diferențe existente între peptidele-antigen prezentate în asociere cu moleculele MHC de clasa I și clasa II. Peptida care ocupă situsul MHC de clasa II este mai lungă, fiind necesară "șlefuirea" ei la extremitatea COOH terminală de către o enzimă (carboxipeptidază).

*T*: La acest nivel se găsesc reziduuri acide, bazice sau non-polare care măresc șansa de atașare a diferitelor polipeptide.

Asocierea cu  $\beta_2$ -m este critică pentru exprimarea complexului MHC-antigen la suprafața celulei și, deci, pentru stimularea limfocitelor *T*. Inițial, peptida ar interacționa într-o manieră reversibilă cu domeniile  $\alpha 1$  și  $\alpha 2$  ale lanțului  $\alpha$ , cu asociații și disociații competiționale în cursul cărora se desprind peptidele slab legate și se asociază cele cu aviditate mare. Se pare că legarea peptidei antigen la "fosa"  $\alpha 1\alpha 2$  nu este în totalitate un proces pasiv, deoarece necesită intervenția ATP și, deci, energie. De asemenea, fixarea, ca și în cazul relației antigen-anticorp, este influențată nu numai de către reziduurile de aminoacizi din secvența peptidei legate, ci și de către unii aminoacizi aflați la distanță de locul de legare, fapt care demonstrează existența unei recunoașteri specifice, condiționată de structura complexă a moleculei de antigen și nu numai de secvența grupării determinante.

Rezultă deci că antigenele străine de organism, pentru a deveni stimulante, trebuie să fie prelucrate sub formă de peptide mici și prezentate de către celulele APC limfocitelor *T* numai în asociere cu moleculele MHC de clasa I sau II, adică "sub restricție MHC". Cele de clasa I se asociază cu peptidele endogene, prelucrate în citosol, iar cele de clasa II, cu peptidele exogene, prelucrate în endozomi. Asocierea cu MHC, în afară de declanșarea reacțiilor imune, contribuie și la selectarea limfocitelor *T* imature, care are loc în timus pentru cele cu receptori  $\alpha\beta$  și în periferie pentru cele cu receptori  $\gamma\delta$ .

Observația că limfocitele *T* recunosc antigenul în asociere cu proteinele de suprafață codificate de către complexul major de histocompatibilitate a înregistrat în ultimii ani o evoluție considerabilă. Inițial se credea că limfocitul *T* recunoaște și leagă molecula de antigen printr-o interacție simplă, de genul celei antigen-anticorp. Demonstrarea ulterioară a faptului că această recunoaștere se face în asociere cu proteinele MHC a modificat conceptul, în sensul că s-a generat ideea existenței unui receptor complex, cu funcție multiplă, în virtutea căreia poate recunoaște atât epitopul cât și moleculele MHC ale celulelor APC. Acum este în afară de orice dubiu faptul că receptorul pentru antigen de pe limfocitul *T* leagă o peptidă mică, rezultată în urma prelucrării moleculei de antigen și fixată într-o "scobitură" a proteinei MHC. Așadar, celula *T* recunoaște antigenul printr-un proces care diferă fundamental de reacția antigen-anticorp.

Restricția MHC a limfocitelor *Th* implică produsele genelor clasei II a MHC (HLA-DP, DQ sau DR), pe când cea a limfocitelor *T* citotoxice, pe cele ale genelor clasei I (HLA-B, C, A). În acest scop, antigenul "brut" este clivat de către celulele APC și redus la dimensiunea unor peptide mici imunogene, care vor forma un complex cu moleculele MHC, capabil să stimuleze fie limfocitele *Th*, fie pe cele *Tc*. După prelucrarea de către celulele APC și reducerea la dimensiunea unei simple peptide, are loc asamblarea lanțurilor  $\alpha$  și  $\beta$  sau a lanțului  $\alpha$  cu  $\beta_2$ -microglobulina vederea formării moleculelor de clasa II sau I a MHC și asociere concomitentă

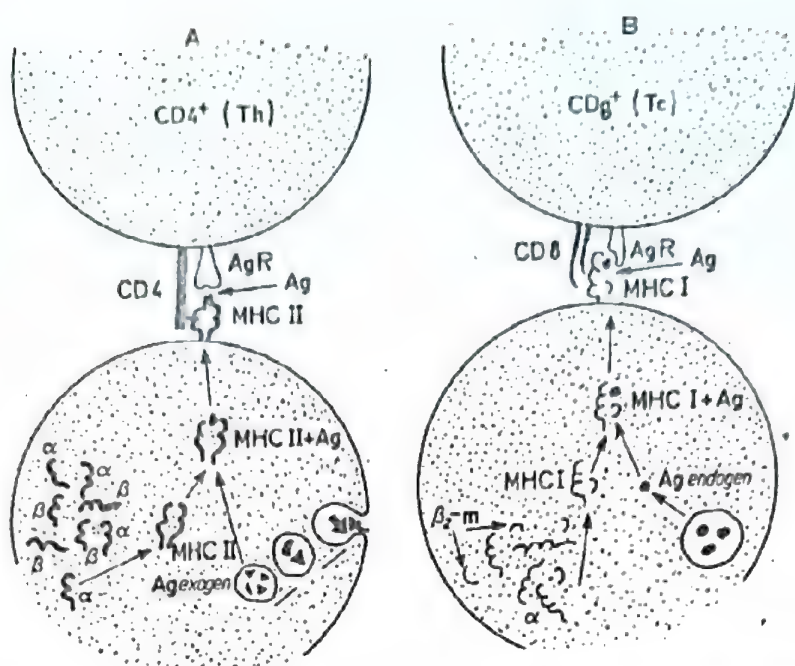


Fig.175. Prezentarea antigenului (Ag), în asociere cu moleculele MHC de clasa I sau clasa II, de către celulele APC.

A. Prezentarea complexului peptidă-antigen + molecule MHC de clasa II limfocitelor Th. Lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$  ale MHC de clasa II se assemblează în citoplasma celulelor APC, formând un "șanț" (o fosă) în care se va fixa peptida stimulatoră (A). Aceasta va fi recunoscută de receptorul pentru antigen (AgR) iar MHC de clasa II de către CD4.

B. Lanțul  $\alpha$  va lega în șanțul format de către extremitatea  $\text{NH}_2$  terminală peptida antigen (A) care va fi recunoscută de AgR de pe celulele Tc. MHC de clasa I va fi recunoscut de lanțul CD8 de pe limfocitul T.

la aceste molecule a peptidei imunogene în vederea stimulării limfocitelor Th sau Tc (fig. 175). După recunoașterea antigenului de către celula T, este activat complexul CD 3 care va transduce semnalul activator în celulă; sunt implicate glicoproteinele CD4 sau CD8 care se vor lega la secvențele constante ale moleculei de clasa II sau I ale MHC, glicoproteinele LFA-1 (CD11a) de pe membrana limfocitului T se leagă la ICAM-1 sau ICAM-2 de pe celula țintă, CD2 de pe T se leagă la LFA-3 de pe țintă, realizându-se în final activarea limfocitului T.

## LIMFOCITUL B, DREPT CELULĂ APC

Capacitatea limfocitelor B de a prezenta antigenul limfocitelor T a fost demonstrată prin sisteme experimentale multiple. Dacă celelalte celule - macrofagele și celulele dendritice - nu au receptori specifici pentru antigen, limfocitele B au asemenea receptori. Ele pot lega antigenul prin receptorii de natură imunoglobulinică prezentându-l apoi foarte eficient limfocitelor T, dovedindu-se excelente APC. Se pare că la prezentarea antigenului de către limfocitele B este necesară selectarea celulelor cu receptori specifici, deoarece s-a constatat că un epitop este eficient prezentat limfocitelor T de către clona care are receptori pentru el și mult mai slab de către alte clone, cu receptori de alte specificități. De asemenea, în cooperarea T-B este o participare "preferențială", o clonă B "colaborând" preferențial cu o anumită clonă de limfocite T, probabil



ambele cu receptori, pentru același determinant antigenic. Nu este bine precizat dacă limfocitele *B* numai rețin antigenul la suprafață prin imunoglobulinele de membrană (mlg), sau îl și prelucerează într-o manieră similară macrofagelor. Unii susțin că este o simplă reținere, dar sunt dovezi experimentale care demonstrează contrariul. Astfel, dacă limfocitele *B* sunt puse în contact cu toxoidul tetanic și cu limfocitele *Th*, acestea din urmă vor fi stimulate și vor prolifera clonal la un anumit grad de intensitate. Dacă, însă, ele sunt incubate cu toxoidul timp de 1 - 2 ore și după aceea sunt amestecate cu limfocitele *T*, răspunsul acestora este mult mai intens. Limfocitele *T* singure nu pot recepționa semnalele de la peptide mici, deoarece acestea trebuie să fie asociate cu molecule MHC, de unde concluzia că limfocitele *B* au prelucrat toxoidul, l-au asociat cu MHC de clasa II și l-au prezentat celulelor *Th* (fig. 176).

Incubarea celulelor *B*, în prezența antigenului și clorochinei care provoacă creșterea pH-ului în endosomi inhibând astfel captarea și prelucrarea, sau în prezența antigenului și a azidei de sodiu sau deoxiglucozei (inhibitori ai metabolismului celular), abolește capacitatea stimulantă pentru celulele *T* a limfocitelor *B* preincubate. Deci, celulele *B* folosesc mlg numai pentru a capta și concentra antigenul, dar nu-l prezintă ca atare celor *T*, ci numai după prelucrarea lui intracelulară și apoi proiectarea la suprafața celulei. Nu se cunoaște exact cum se face această prelucrare dar, în orice caz, proteinele mari nu sunt accesibile acestui tip de interacție, candidați fiind numai peptidele mici, mărimea moleculei de antigen având importanță crucială în procesul de recunoaștere de către limfocitele *T*.

Și în cazul acestor celule APC, prezentarea antigenului se face sub restricție MHC. Ca dovadă, limfocitele *B* prezintă toxoidul tetanic celulelor *T* autologe, dar nu și celor alogene, iar anticorpii anti-molecule MHC de clasa II inhibă cooperarea *B-T*. Această cooperare se realizează în condițiile unei concentrații de antigen

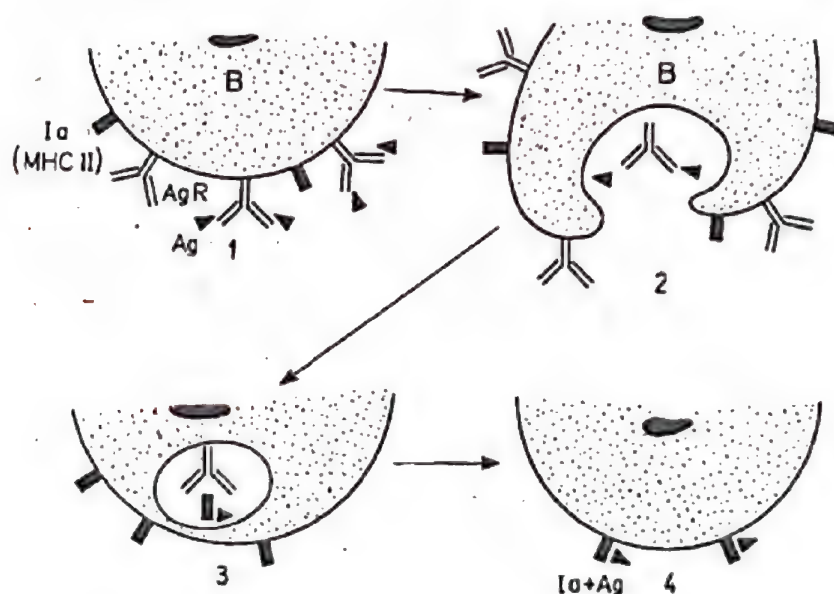


Fig. 176. Funcția limfocitului *B* ca celulă prezentatoare de antigen.

1. Limfocitul *B* fixează antigenul (Ag) la receptorul pentru antigen (AgR) de natură imunoglobulinică.
2. Complexul format este endocitat (printr-un proces de capping ?).
3. Intracitoplasmatic are loc disocierea antigenului de receptori și probabil asocierea la moleculele MHC de clasa II.
4. Antigenul asociat cu MHC de clasa II (Ia+Ag) este exprimat pe membrana plasmatică, fiind recunoscut de către limfocitele *T*.

extrem de scăzute, fiind necesară cointeresarea unui număr foarte mare de receptori mlg. Acest fapt demonstrează că, în cazul prezentării antigenului de către limfocitele *B*, nu este necesară aglomerarea receptorilor pentru antigen.

Ar fi deci următoarele momente în exercitarea funcțiilor APC de către celulele *B*: a) recunoașterea și reținerea antigenului de către limfocitele *B* prin receptorii mlg, care se poate realiza specific și nespecific; b) prelucrarea lui; c) asocierea cu moleculele MHC de clasa II; d) prezentarea complexului antigen-molecule clasa II, limfocitului *Th* ( $CD4^+$ ).

Limfocitele *B* sunt extrem de eficiente ca celule APC, putând prezenta antigenul limfocitelor *T* chiar și atunci când acesta se găsește în concentrații foarte scăzute (de 1 000 ori mai mici decât concentrațiile necesare pentru alte celule APC). Cu toate acestea, ele nu sunt capabile să asigure toate semnalele necesare pentru activarea populației *T*; acestea au nevoie de IL-1 sau de celule care produc IL-1 pentru a se angaja în ciclul de dezvoltare celulară.

## PREZENTAREA ANTIGENULUI DE CĂTRE CELULELE DENDRITICE

Prezentarea antigenului de către celulele dendritice se realizează prin modalități diferite: în absența sau în prezența moleculelor MHC de clasa I sau II. Sunt celule APC foarte "potente", care exprimă intens moleculele B7/BB1 și MHC de clasa II. Pentru activarea limfocitelor *T*, sunt necesare cca. 100 - 200 de complexe peptidă + antigene MHC de clasa II. Antigenele exogene sunt prezentate eficient de către celulele dendritice numai atunci când sunt în cantitate mare.

Celulele dendritice foliculare, din foliculii secundari, sunt lipsite de moleculele MHC de clasa II, așa că ele pot prezenta celulelor  $CD4^+$  antigenul reținut pe suprafața lor, fără restricție MHC. În medulara timusului însă, sunt celulele dendritice interdigitale bogate în antigene proprii, inclusiv cele MHC, pe care le prezintă limfocitelor *T* imature "învățându-le" să facă distincția dintre propriu și non-propriu. Studii mai recente, care au folosit tulpini mutante de șoareci care se deosebeau între ele prin poziția a trei reziduuri de aminoacizi la nivelul domeniilor  $\alpha 1$  și  $\alpha 2$  ale moleculelor de clasa I sau clasa II a H-2, au demonstrat capacitatea celulelor dendritice de prezentare a antigenului sub restricție MHC. Este posibil ca aceste celule APC, situate în poziții strategice la nivelul organelor limfoide, să rețină pe suprafața lor atât antigenul, cât și moleculele MHC libere, să le asocieze și apoi să le prezinte limfocitelor. Activarea limfocitelor *T*, în special a celor  $CD4^+$ , necesită ocuparea heterodimerului  $\alpha\beta$  al receptorului pentru antigen al limfocitelor *T* de către peptidele prelucrate și exprimate pe suprafața APC împreună cu moleculele MHC de clasa II. Dar, diferitele celule APC se deosebesc între ele prin potențialul și modalitatea lor de stimulare *T*. Unele, mai puțin eficiente în conexiunea moleculelor lor de clasa II cu  $CD4^+$  sau în eliberarea de semnale costimulatoare, sunt mai ineficiente. Activarea costimulatoare este realizată de către macrofage, celule dendritice, celulele *B* activate, dar nu este realizată deloc sau foarte slab de către limfocitele *B* în stare de repaus sau de către limfocitele *T*. Ar fi secvențe diferite de activare a limfocitelor *Th*. Celulele dendritice ar prezenta acestora diferite epitopuri dominante. Limfocitele *T* astfel "angajate" ar activa limfocitele *B* care, prin receptorii pentru antigen de natură imunoglobulinică, vor recunoaște specific



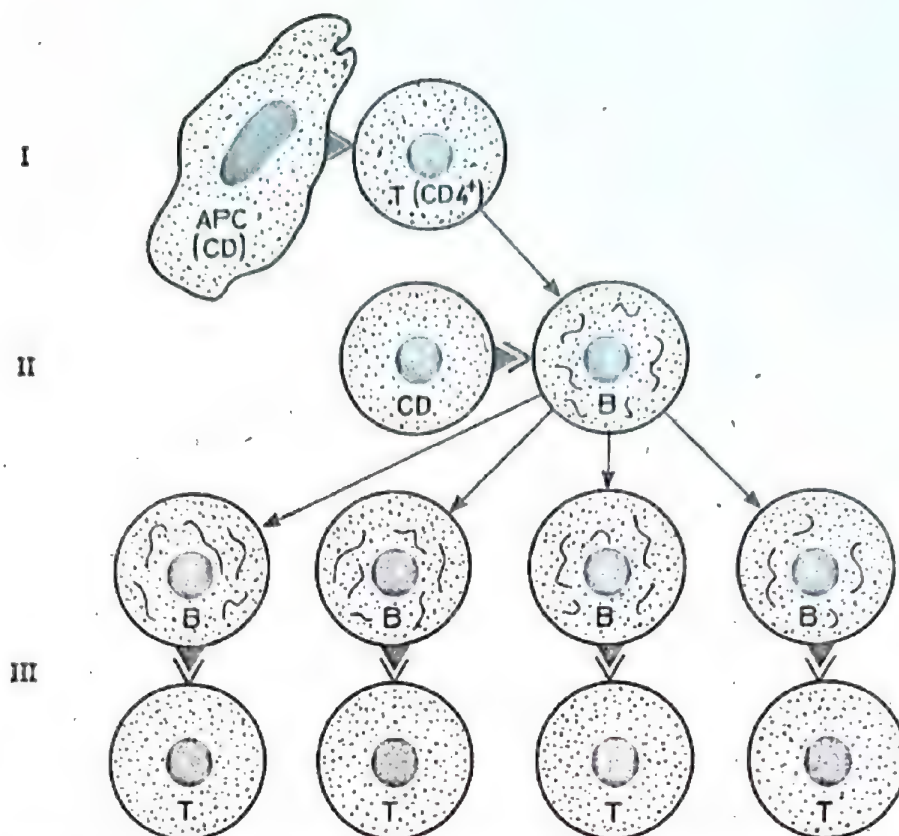


Fig.177. Mod de cooperare între limfocitele T, B și celulele APC (dendritice = CD).

CD prezintă antigenul limfocitelor CD4 care, odată angajat, cooperează specific cu limfocitele B. Limfocitele B activate internalizează epitopii, realizând diversificarea limfocitelor T naive care, la rândul lor, vor activa diversificarea celulelor B (după M.J. Mamula și Ch.A. Janeway).

antigenul, devenind la rândul lor excelente celule prezentatoare de antigen ce vor stimula eficient alte limfocite  $CD4^+$  "naive" (fig. 177).

Așadar, în cooperările celulare care se instalează, consecutiv stimulului antigenic, participă diferite celule APC care recunosc, prelucrează și prezintă antigenul limfocitelor  $T_h$  sau  $T_c$  în maniere diferite. Macrofagele-monocitele, limfocitele B și celulele dendritice sunt populațiile majore de celule antigen-prezentatoare. Se pare însă că și limfocitele T au un rol minor în astfel de funcții. De regulă, ele nu sunt APC deoarece sunt incapabile să capteze antigenul în manieră nespecifică, dar ar fi capabile să-l prelucreze pe cel legat specific la receptori și în special la gp 120 a HIV (virusul imunodeficienței umane) pe care limfocitele  $CD4^+$  îl prezintă celor  $CD8^+$  ca semnal de activare a funcțiilor citotoxice pentru celulele infectate. Cooperările celulare educă sau stimulează limfocitele T în vederea angajării lor ca celule efectoare sau de memorie. În timpul educării, clonele autoreactive sau cu deficite funcționale sunt eliminate sau supresate.

## COOPERĂRI CELULA APC - LIMFOCITE B

Se crede că foliculii limfoizi și centrul lor germinativ, din organele limfoide secundare și în special din splină, ar fi locul manipulării antigenelor unde s-ar face informarea limfocitelor B de memorie și activarea lor pentru a deveni celule efectoare. Informațiile despre antigen ar fi furnizate de către celulele dendritice foliculare care ar reține complexe antigen-anticorp prin receptori pentru Fc

sau complement și le-ar prezenta apoi celulelor *B* de memorie. Celulele dendritice sunt cele mai "profesionale" APC din țesuturile limfonodulare. Ele sunt influențate în funcțiile lor de către diferite limfokine, de metaboliți ai vitaminei *D* și cooperează nu numai cu limfocitele dar și cu macrofagele care ar prelucra o parte din antigenul prezentat de către celulele dendritice.

După stimulare, limfocitele *B* ar coloniza zonele marginale splenice și centrul germinal folicular unde s-ar dezvolta în celule formatoare de anticorpi și celule de memorie. Celulele *B* care nu interacționează cu cele dendritice mor prin "apoptosis", fiind eliminate de către celulele fagocitare.

## COOPERĂRI ÎNTRE LIMFOCITELE *T* ȘI *B*

Descoperirea existenței celor două clase majore de limfocite - *T* și *B* - a marcat debutul perioadei moderne a imunologiei. În anul 1960, R. GOOD constată că șoarecii cu timoame sunt hipogamma- globulinici și nu pot reacționa la stimulii antigenici. În același timp, J.F.A.P. MILLER demonstrează experimental că absența timusului antrenează grave dezordini imune.

Se credea că timusul este unicul organ central al sistemului imun până în 1966 când H.M. CLAMAN, prin iradiere și reconstituiri, demonstrează că de fapt sunt două populații celulare majore, cunoscute ulterior sub denumirea de *T* și *B*, care cooperează între ele. Printr-o experiență ingenioasă, s-a dovedit că limfocitele *T* au rol ajutător iar cele *B* secretă imunoglobuline. Experiența a constatat din iradierea șoarecilor *CBA* și reconstituirea lor cu celule timice, deci cu *T* recoltate de la alți șoareci *CBA* și cu măduvă osoasă (*B*) de la o subțulpină de *CBA* cu o anomalie cromozomială, denumită *CBAT 6T 6*. Limfocitele care secretau anticorpi aveau această anomalie, deci erau celule *B*. Dacă șoarecii iradiați erau reconstituiți cu celule timice de la *CBAT 6T 6* și medulare de la *CBA* normali, celulele secretoare de anticorpi nu mai erau *T 6 T 6*, demonstrându-se fără echivoc că celulele *B* produc anticorpi dar că, pentru această funcție a lor, au nevoie de ajutorul celulelor *T*.

Acum se știe că această colaborare dintre limfocitele *T* și *B* este necesară atât pentru activarea funcțională a ambelor clase de celule, cât și pentru controlul răspunsului imun. Până nu de mult, se cunoștea numai necesitatea ajutorului obligatoriu al limfocitelor *T* h pentru stimularea funcțională a celulelor *B* și activarea sintezei anticorpilor.

La acest nivel al cunoștințelor, relația *T* h-*B* este limitată la două momente:

a) Antigenul transmite limfocitelor *B* primul semnal ca urmare a legării încrucișate a imunoglobulinelor de membrană (mIg), în urma căruia se induc semnale activatoare intracelulare, sinteza ARN și comutarea celulelor din ciclul *G*<sub>0</sub> la *G*<sub>1</sub>. În acest stadiu, celulele exprimă receptori pentru limfokinele eliberate de către limfocitele *T* h;

b) Intervin limfocitele *T* h care eliberează semnalul II și completează ciclul celular de la faza *G*<sub>1</sub> la faza *S* și apoi *G*<sub>2</sub>, acționând prin două mecanisme distincte, și anume, prin interacțiuni "înrudite" sub restricție MHC clasa II sau prin factori solubili, fără restricție MHC, ca urmare a intervenției IL-2, IL-4, IL-5, IFN $\gamma$  etc. (tabelul 97).



Tabelul 97

## Diferite stadii de activare a limfocitelor B

Stadiile ciclului celular					
$G_0$	$G_0^+$	$G_1$		$S$	$M$
		$G_1A$	$G_1B$		
	Exprimarea antigenelor MHC clasa II	Cresc volumul celulei și sinteza ARN		Sinteza ADN	Diviziunea celulei

În  $G_0^+$  se activează exprimarea antigenelor MHC de clasa II.

În faza  $G_1$  timpurie ( $G_1A$ ), începe să crească volumul celulei iar în  $G_1$  târziu ( $G_1B$ ) celula este angajată spre fazele ulterioare, de sinteză a ADN ( $S$ ), diviziune ( $M$ ) și apoi de repaus ( $G_2$  și  $G_0$ ).

Exprimarea celor două mecanisme este condiționată de starea de activare a limfocitelor  $B$  și  $T$ . Pentru activarea limfocitelor  $B$  aflate în repaus ( $G_0$ ) este necesar contactul direct cu  $T$  h antigen - specifice și sub restricție MHC. Creșterea și diferențierea celulelor  $B$  activate nu ar necesita contact direct sub restricție MHC, ci doar intervenția unor citokine. Dar, se pare că și celulele  $B$  aflate în repaus pot fi totuși activate în absența unei "punți"  $T$  h- $B$ , limfocitele  $CD4^+$  putând transmite semnale către  $B$  fără restricție genetică și specificitate pentru antigen. O proteină de 33 - 39 kD din membrana limfocitelor  $T$  activate, chiar atunci când este desprinsă de membrana celulară, se leagă la moleculele  $CD40$  de pe membrana plasmatică a limfocitelor  $B$ , declanșând creșterea și diferențierea acestora. Așadar, în cazul restricției MHC ar fi necesar contactul direct, fizic, între  $T$  h și  $B$ , contact suficient pentru a activa angajarea celulelor  $B$  în ciclul celular. De exemplu, limfocitele  $T$  h nu mai pot activa celulele  $B$  dacă sunt despărțite printr-o membrană semipermeabilă, fapt care demonstrează că limfocitele  $B$  au nevoie de contactul nemijlocit, sub restricție MHC cu  $T$  h activate. Dar recent s-a dovedit că celula  $B$  poate prelucra antigenul molecular, necorpusculat, acționând ca celulă APC: inițial îl leagă la membrană, îl endocitează și prelucrează în citoplasmă și apoi îl prezintă limfocitelor  $T$ . La nivelul membranei plasmatice, limfocitele  $B$  ar avea un ligand -  $B7$ - pentru receptorul  $CD28$  de pe suprafața limfocitelor  $T$ , receptor care de fapt este o glicoproteină homodimeră de 44 kD care ar funcționa ca factor de creștere și ar constitui un sistem heterofil de recunoaștere celulară implicat în prezentarea antigenului de către celula  $B$ , în cooperarea  $T$ - $B$  și în amplificarea semnalelor intracelulare la nivelul limfocitului  $T$ . *In vivo*,  $CD28$  ar funcționa atât ca moleculă de adeziune pentru stabilirea contactelor  $T$ - $B$  cât și drept component de suprafață pentru o cale de transducție a unui nou semnal.

În aceste condiții, receptorul pentru antigen de pe celula  $B$  prezintă antigenul celulei  $T$  h activând-o, activare care va antrena alte limfocite  $B$  astfel că, în realitate, activarea populației  $T$  h de către celulele  $B$  prezentatoare de antigen este de fapt o relație cu dublu sens, semnalele activatoare mergând de la  $B$  către  $T$  și de la  $T$  în spre  $B$  (fig. 178). Nu există diferențe funcționale semnificative condiționate de maniera interacțiilor celulare, adică de instalarea de contacte fizice directe între celule, sub restricție MHC sau în afara contactelor directe, prin mediatori solubili, fără restricție MHC.

Interacțiunea dintre celulele  $T$  și APC ( $B$ ) are urmări pentru ambele tipuri de celule:  $B$  stimulează  $T$  care, odată activate, vor produce limfokine (IL-2, IL-4, IL-5,

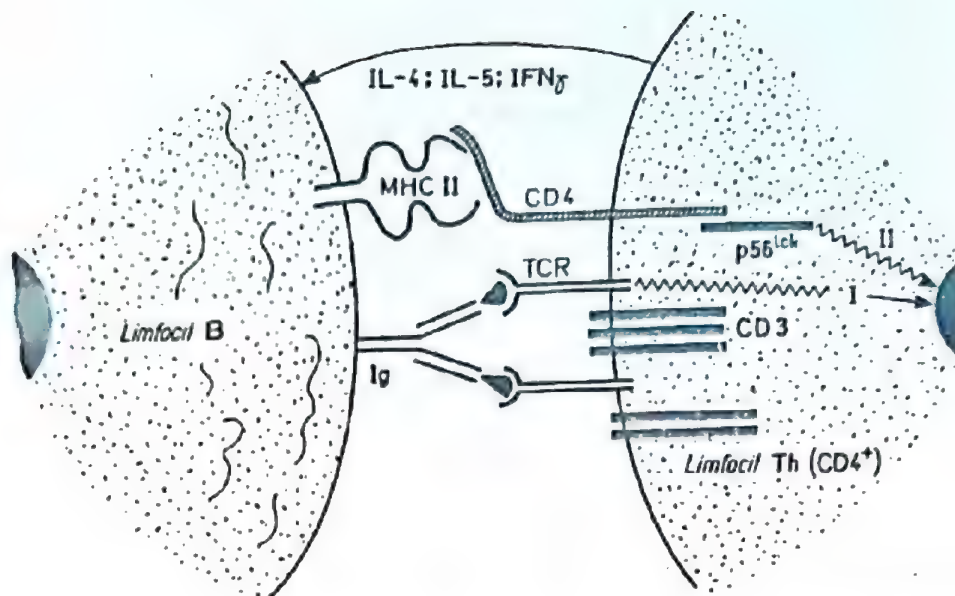


Fig.178. Stimularea reciprocă a limfocitelor CD4 (Th) și B. Limfocitele Th primesc semnalul I de la antigenul prezentat de către limfocitele B prezentatoare de antigen. Stimulate, vor secreta limfokine care vor activa celulele B.

MIF, MAF,  $IFN-\gamma$  etc.) cu efect stimulant pentru B. Unele date indică existența unor interacțiuni între două subpopulații de limfocite T distincte fenotipic, în vederea proliferării lor consecutiv stimulării cu anticorpi anti-CD3 în prezență de IL-2 exogenă: una dintre subpopulații este  $CD3^+HLA-DR^-$  iar alta,  $CD3^+HLA-DR^+$ . Prima nu răspunde la anticorpi anti-CD3 și IL-2 decât în prezența celei de-a doua subpopulații, adică a celei  $DR^+$ . Dacă celulele  $CD3^+HLA-DR^+$  sunt iradiate, populația  $DR^-$  nu poate răspunde la stimulul cu anticorpi anti-CD3. Deci, este necesară cooperarea T-T între subpopulațiile  $DR^+$  și  $DR^-$  care să antreneze mobilizarea  $DR^-$  spre proliferare celulară, în condițiile existenței IL-2 și macrofagelor, de unde concluzia că ambele subpopulații au receptori pentru IL-1 și IL-2.

Există cooperări între limfocite aparținând claselor T sau B, adică cooperări T-T și cooperări B-B. De asemenea, limfocitele T h sau T s controlează funcțiile Tc, iar cele B activate pot mări de câteva ori răspunsul proliferativ policlonal și sinteza de anticorpi a limfocitelor B stimulate cu anticorpi anti- $\mu$  sau cu limfokine. Activarea limfocitelor T este consecința interacțiunilor ligand-receptor, interacțiuni posibile datorită celulelor APC. Semnalul transmembranar inițiază semnale secundare care funcționează ca releu chimice și antrenează limfocitul din poziția  $G_0$  spre celelalte timpurii, realizate consecutiv transducției semnalelor de la receptor urmate de cele târzii (proliferative) ca rezultat al cascadei de evenimente intracelulare. În timpul procesului de activare T, sunt reacții prompte, instalate în decurs de secunde sau minute după stimul, și reacții târzii, de ordinul orelor sau zilelor (fig. 179).

Activarea poate fi exprimată prin antrenarea funcțională a unor gene latente, ca de pildă *c-fos* și *c-myc*, sinteza de noi molecule și în special secreția de limfokine, exprimarea de receptori de membrană cum ar fi IL-2R, a receptorilor pentru transferină, proliferarea celulară și, în final, exprimarea funcțiilor efectoare ale celulei ca de pildă funcțiile citotoxice. Sinteza limfokinelor sau monokinelor permite realizarea de cooperări celulare fără restricție MHC, care pot coexista cu cele care se instalează sub restricție MHC.



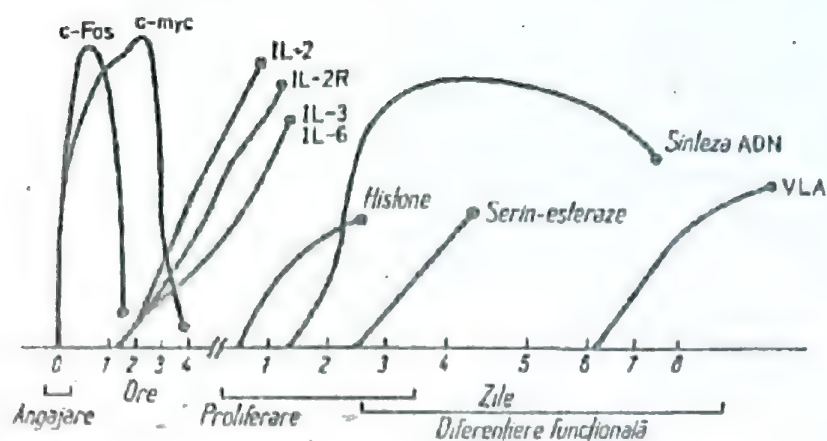


Fig. 179. Secvențe ale unor evenimente care au loc intracelular, ca urmare a activării limfocitului T de către antigen. (după K.S. Ullman și col.).

## COOPERĂRI ÎNTRE DIFERITE POPULAȚII DE CELULE APC

Cooperările intercelulare sunt procese biologice complexe, prin care celulele transmit și primesc semnale informative, operații care au loc simultan sau la intervale de timp foarte scurte. În aceste procese, sunt interesate și diferite populații de APC care colaborează între ele pentru o mai eficientă prelucrare și prezentare a antigenului. Un exemplu semnificativ este cel care se instalează *in vivo* la nivelul splinei. În zona marginală a acestui organ, pătrund prin artera splenică atât celule cât și antigene. De aici, limfocitele B migrează spre foliculii limfatici unde devin, sub influența celulelor dendritice (CD), limfocite B de memorie, iar limfocitele T populează ariile periarteriolare unde pot interacționa cu celulele interdigitale. Nici CD nici limfocitele B nu pot endocita și prelucra antigene particulare, această funcție revenind macrofagelor din zona marginală. Acestea ocupă o poziție strategică la capătul capilarelor pulpei albe, ingerând o mare parte din antigenele particulare care ajung în splină, pe care le degradează în peptide antigenice, prezentându-le limfocitelor B, T sau celulelor dendritice.

Limfocitele B aderă puternic la macrofage, între aceste două tipuri de celule stabilindu-se interacții foarte strânse. Celulele dendritice sunt plasate spre pereții arteriolelor de la nivelul zonelor T dependente, putând veni în contact strâns cu limfocitele T. În acest fel, ocupă o poziție strategică, deoarece la extremitatea interioară a foiței periarteriolare vin în contact cu celulele dendritice, iar la cea exterioară cu celulele B și macrofagele. Este posibil ca celulele dendritice să prezinte antigenul după ce a fost internalizat și prelucrat de către alte celule APC, stabilindu-se astfel cooperări între diferite clase de APC în scopul amplificării potențialului de informare a limfocitelor efectoare. Se pare că, contactul celule dendritice cu cele T are loc înaintea celui B+T, aceasta fiind ultima interacție de cooperare a limfocitului B înainte de a deveni celulă secretorie, adică plasmocit. Ar fi deci, în special în cazul antigenelor particulare, următoarele cooperări celulare: macrofage + celule dendritice; macrofage + limfocite B sau T; celule dendritice + limfocite B; limfocite B (funcționând ca APC) + limfocite T și, desigur, limfocite Th + limfocite B sau, Th+Tc. Aceste cooperări pot fi secvențiale sau simultane, interesând în aceeași unitate de timp două sau mai multe populații celulare.



## APOPTOSIS (MOARTEA PROGRAMATĂ A CELULEI)

*Apoptosis* este o formă dominantă a morții celulare programate, un fel de program eficient de autoeliminare, de sinucidere a ei.

Această sinucidere începe cu contracția volumului celulei, consecutiv condensării nucleului și citoplasmei, urmată de activarea endonucleazelor, clivarea ADN-ului și formarea de "corpi apoptotici". Un element care intervine în acest program de moarte dirijată este o transglutaminază tisulară dependentă de  $\text{Ca}^{2+}$  care, acumulându-se în celule, va genera formarea de  $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{-lizină}$ , creșterea pragului cAMP și a  $\text{Ca}^{2+}$ . Încă nu se cunosc evenimentele biochimice care reglează moartea și nici genele care controlează aceste evenimente. Ar exista gene pentru apoptosis, ca de pildă cele care controlează sinteza proteinei apoptotice *p53* și a transglutaminazei tisulare dependentă de  $\text{Ca}^{2+}$ , dintre care unele sunt exprimate funcțional, iar altele nu sunt exprimate dar pot fi induse. Aceste "gene ale morții" ar fi contracarate de către gene ale căror produse, cum ar fi proteinele mitocondriale *bcl-2*, blochează programarea morții celulare. Aceasta nu are loc atât timp cât se menține un echilibru funcțional între genele apoptotice și cele de supraviețuire.

Intervenția unui semnal de la un factor apoptotic poate suprima exprimarea genelor de supraviețuire și iniția programul de omorâre a celulei. Opusul acestei situații este blocarea morții prin hiperfuncția unor gene ca *Bcl-2*, *c-myc*, *ras* etc. ce menține la un nivel crescut rata de proliferare celulară care devine nocivă pentru organism. Se pare că alterarea balanței între proliferarea celulei și moartea ei, care de regulă duce la proliferări neoplazice, poate fi instalată fie printr-o accentuare a proliferării cu menținerea ratei de deces la nivel normal, fie prin menținerea proliferării la nivel normal și scăderea ratei de deces.

La șoarecii transgenici care au un prag crescut de proteine *bcl-2* se înregistrează o frecvență crescută a tumorilor spontane, deoarece genele apoptotice sunt inhibitate iar cele antiapoptotice activate. Apoptoza este un component important al reglării răspunsului imun, limfocitele *T* și *B* stimulate devenind imediat susceptibile la moarte.

## CITOKINELE, AGENȚI DE COMUNICARE INTERCELULARĂ

Răspunsul imun este de fapt amplificarea unor funcții consecutiv unor modificări foarte mici în balanța homeostatică, care debutează cu reacții locale și se extind progresiv până când cuprind întregul organism. De la răspunsul local, care are loc la nivelul unde a penetrat antigenul, se ajunge la răspuns sistemic și în final la restaurarea integrității tisulare și funcționale. Principalele celule implicate în aceste fenomene sunt celulele APC și limfocitele, procesul de amplificare fiind bidirecțional: macrofagele instruiesc limfocitele care proliferază și recrutează alte macrofage în vederea amplificării fenomenelor și restaurării homeostaziei. Pentru a coopera între ele, celulele realizează contacte directe, principalul agent de legătură fiind antigenul și moleculele de adeziune, precum și diverse lectine, anticorpi etc. (fig. 180).

Dar comunicările se realizează și la distanță, prin mediatori solubili. De exemplu, dacă limfocitele *T* sunt stimulate cu lectine, nu proliferază clonal decât în prezența macrofagelor care eliberează un al doilea semnal, respectiv IL-1. Ele pot



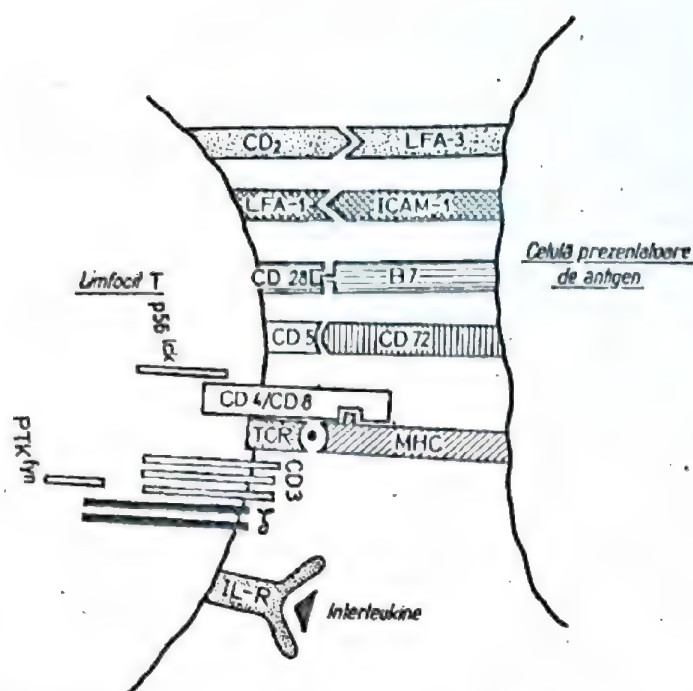


Fig.180. Două modalități diferite de stimulare a limfocitelor T. Acestea pot fi antrenate funcțional de către antigen (a) recunoscut specific prin receptorul pentru antigen (TCR) sub restricție MHC, proces în care intervin diferite alte molecule de adeziune. Stimularea poate fi însă declanșată sau amplificată și prin receptorii pentru diferite citokine, ca de pildă receptorii pentru interleukine (IL-R).

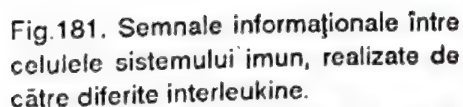
transmite acest semnal prin contact celulă-celulă, sau la distanță. Această posibilitate a fost demonstrată experimental prin cultivarea limfocitelor *T* separate de macrofage printr-o membrană Millipore care permite circulația moleculelor, dar nu și a celulelor. În aceste condiții, celulele *T* stimulate policlonal proliferază, deși nu sunt în contact strâns cu macrofagele, deoarece primesc semnale prin mediatori solubili eliberați de către acestea, mediatori care au putut traversa membrana despărțitoare. În cazul limfocitelor *B*, activarea poate fi realizată de către limfocitele *T* h prin "puntea de antigen" care unește cele două clase de celule, limfocitul *T* recunoscând gruparea purtătoare iar *B* epitopul, sau prin limfokinele secretate de către *T* care vor stimula proliferarea și diferențierea în diferite faze ale multiplicării celulare.

Limfokinele și monokinele sunt "limbajul sistemului imun", fiecare dintre ele fiind de fapt un cuvânt al acestui limbaj, care se poate limita strict la un singur sens, sau la mai multe sensuri, așa cum este cazul cuvintelor din vorbirea curentă. Dar, așa și în cazul cuvintelor, este necesară asocierea acestora pentru a se putea obține un sens.

Așa cum un singur cuvânt nu poate exprima o idee complexă, nici o singură citokină nu poate dirija un proces celular. Sunt necesare două sau mai multe citokine iar relația dintre ele este destul de complexă, în sensul că diferite citokine pot avea aceeași activitate, ca de pildă IL-1 și TNF- $\alpha$ , sau se pot influența reciproc, cum este cazul IL-4 și IFN- $\gamma$ . Uneori, pentru realizarea unui proces mai complex, este necesară prezența mai multor citokine. De exemplu, macrofagele pot deveni rezistente la infecția cu *Leishmania major* numai dacă sunt tratate cu IFN- $\gamma$  asociat cu IL-2, IL-4 sau GM-CSF. Tratarea celulelor cu alte combinații, ca de pildă numai cu IL-2 + IL-4 sau cu IL-2 + GM-CSF, este inefficientă, fiind obligatorie asocierea IFN- $\gamma$  cu oricare dintre cele trei citokine. Atât IL-4 cât și IL-5, dacă acționează separat, au o influență minoră asupra sintezei IgA, dar adiția simultană a ambelor este puternic stimulată pentru celula secretoare deoarece IL-4 potențează funcțiile IL 5.

Citokinele mediază nu numai funcțiile imune normale exprimate umoral sau celular, dar și reacțiile de hipersensibilitate unde inhibă sau stimulează secreția, proliferarea și diferențierea diferiților efectori celulari, sau chiar repararea injuriilor tisulare ca urmare a stimulării sintezei de colagen și proliferării fibroblastelor. În acest din urmă caz, diferite celule ale sistemului imun se influențează reciproc, eliberând citokine care vor stimula creșterea fibroblastelor. Este cazul macrofagelor, celulelor LGL, limfocitelor *T* și *B*, ale căror secreții pot stimula proliferarea acestor celule.

Dar rolul major al citokinelor, acești factori solubili antigen-nespecfici în cadrul cărora sunt incluse interleukinele, interferonii, diferiți factori de creștere etc., revine reacțiilor imune specifice, unde exercită un control complex participând la reglarea funcțională a cooperărilor celulare, începând de la nivelul organelor limfoide primare până la celula efectoră (fig. 181). Ele se leagă la receptorii celulari, generând semnale spre nucleu care vor activa sau inhiba diverse funcții. Se realizează o adevărată "rețea" de mesageri solubili care stabilesc conexiuni multiple, începând cu celula matcă și terminând cu celula efectoră.



→ = semnale activatoare  
sau inhibitoare.



Diferite activități biologice ale unor limfokine asupra celulelor umane  
(după F. Balkwill)

Activitatea	IFN			TNF	LT	Interleukine					GM-CSF
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$			1	2	4	5	6	
Citotoxicitate pentru celulele tumorale	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Citotoxicitate pentru alte celule	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Mitogen pentru celule	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Activează celulele B	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
Stimulează proliferarea B	-	-	?	+	+	+	+	+	-	+	-
Stimulează diferențierea B	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
Activează limfocitele T	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Stimulează proliferarea limfocitelor T	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Stimulează diferențierea limfocitelor T	-	-	+	+	-	?	+	+	-	+	-
Induce exprimarea moleculelor MHC de clasa I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Induce exprimarea moleculelor MHC de clasa II	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Activează macrofagele	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Stimulează activitatea granulocitelor	-	-	-	+	+	?	-	-	-	-	+
Stimulează activitatea celulelor NK	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Induce instalarea rezistenței antivirale a celulelor	-	+	+	+	+	-	-	-	-	?	-

IFN = interferon; TNF = factorul de necroză a tumorilor; LT = limfotoxine; GM-CSF = factorul granular-macrofag de stimulare a coloniilor;

- = lipsă de efect; + = prezența efectului; ? = efect necunoscut.

Activitatea lor este multiplă, mergând de la efecte mitogene pentru unele celule până la efecte citotoxice pentru altele (tabelul 98). În acest fel, ele contribuie nu numai la reglarea răspunsului imun, dar și la deprimarea clinică a unor simptome caracteristice șocului endotoxic, infecțiilor etc. De exemplu, IL-1 $\alpha$  și  $\beta$  protejează celulele matcă de iradiatii, dar distrug celulele  $\beta$  din insulele lui Langerhans. Stimulează eliberarea de hormoni pituitari și producerea de prostaglandine, dar și sinteza de collagenaze care provoacă distrugerii ale cartilajelor. În doze moderate, IL-1 poate acționa ca adjuvant, poate provoca febră, somnolență etc. În doze mai mari provoacă anorexie, hipotensiune, putând avea chiar efect letal. În sindromul șocului septic, se realizează un lanț de evenimente (infecție  $\rightarrow$  sinteză

crescută de IL-1 → activarea sintezei de prostaglandine, oxizi nitrici, PAF → hipotensiune), care atunci când depășesc anumite limite pot fi nocive pentru organism.

Unele citokine pot stimula proliferarea neoplazică, ca de pildă IL-6, un potent mitogen pentru celulele mielom umane care sintetizează și exprimă receptori pentru această interleukină; altele, ca TNF, distrug celulele neoplazice. Generate local, la locul inflamației sau al răspunsului imun, ele pot avea influențe majore sistemice în reglarea și controlul funcțiilor de apărare imună a organismului, motiv pentru care sunt folosite, uneori cu rezultate încurajatoare, ca imunomodulatori în diferite afecțiuni care interesează sistemul imun.



## DINAMICA RĂSPUNSULUI IMUN. MECANISME EFECTOARE CARE INTERVIN ÎN NEUTRALIZAREA ANTIGENULUI

Organismul poate neutraliza agresorul prin anticorpi și prin celule. Prima modalitate este denumită "mediată umoral" și se realizează la distanță de plasmocitul secretor, deoarece moleculele de imunoglobulină cu funcție de anticorp pătrund în circulație și de acolo se răspândesc în tot organismul. A doua modalitate este denumită "mediată celular" și este efectuată direct de către celulele citotoxice.

Diferențele sunt oarecum arbitrare, deoarece nu se poate face o delimitare categorică între imunitatea mediată umoral și cea mediată celular. În fond, anticorpii sunt sintetizați tot de către celule iar acestea, pentru a ajunge în stadiul de plasmocit, primesc informații și semnale ajutătoare de la alte celule.

Cu alte cuvinte, nu poate exista sinteză de anticorpi fără stimulare și cooperare celulară. La rândul lor, celulele efectoare își exercită de multe ori efectul citotoxic în prezența anticorpilor, cum este cazul citotoxicității mediate celular anticorp-dependente sau al fagocitozei opsonice. Dar nici nu se poate vorbi de o prea mare asemănare între aceste două mecanisme de apărare imună. Imunitatea mediată prin anticorpi se deosebește mult de cea mediată celular: este transmisibilă prin ser, moleculele efectoare pot activa complementul, sinteza lor se face în condițiile primirii de semnale de la antigen și de la alte celule sau molecule, iar neutralizarea agresorului este foarte rapidă, fiind realizată prin aglutinare, precipitare sau liză. Imunitatea mediată celular este transmisibilă prin celule, este efectuată de către diferite populații efectoare cum ar fi limfocitele *T* citotoxice, celulele *NK*, *K*, macrofagele, iar distrugerea țintei agresoare se face prin contact direct. Celulele citotoxice pot recunoaște specific antigenul numai sub restricție MHC, cum este cazul limfocitelor *T<sub>c</sub>*, sau pot recunoaște antigenul în afara acestei restricții (*NK*, *LAK*, *K*, monocite, macrofage).

Înainte de contactul cu antigenul, în organism nu există decât urme de molecule de anticorp cu specificitate pentru el, anticorpi care sunt de fapt receptori pentru antigen desprinși de pe suprafața limfocitelor *B* imunocompetente dar încă neangajate. După primul contact cu antigenul, limfocitele *B* încep să sintetizeze imunoglobuline cu funcție de anticorp, sinteză care se desfășoară în patru etape distincte: *a) faza de latență*; *b) faza de creștere exponențială sau "logaritmică"*, *c) faza de stagnare* și *d) faza de declin*.

Dinamica sintezei anticorpilor după primul stimul antigenic (stimul primar) se înscrie pe o curbă care are o pantă mai alungită către partea dreaptă (fig. 182). Imediat după contactul cu antigenul, în organism nu este perceptibilă nici o modificare. Acum este "faza de latență", care separă momentul contactului celulelor sistemului imun cu antigenul de momentul apariției primilor anticorpi. Durata acestei faze este determinată de o multitudine de factori, cum ar fi calea

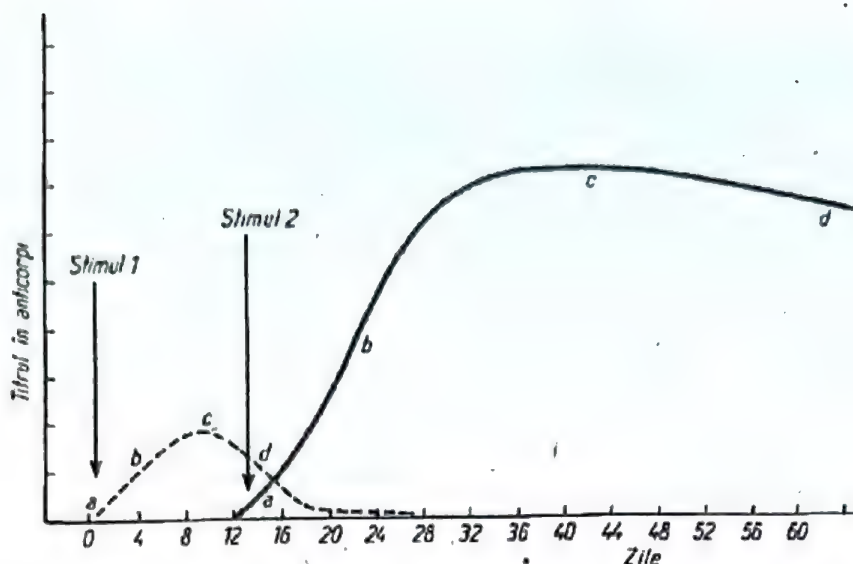


Fig.182. Dinamica sintezei anticorpilor după stimulul antigenic secundar (stimul 2).

Anticorpilor din clasa IgM, de răspuns primar, scad din circulație (linia întreruptă) iar cei din clasa IgG, de stimul secundar (linia continuă), se mențin la un titru crescut.

a = perioada de latență; b = perioada de creștere logaritmică; c = faza staționară; d = faza de declin.

de inoculare, doza de antigen inoculată, imunogenitatea lui etc. În general, această fază durează 2 - 3 zile, timp în care antigenul este fagocitat, prelucrat și prezentat de către celulele prezentatoare de antigen limfocitelor T și B. Acum sunt activate limfocitele Th, limfocitele B, macrofagele și începe cooperarea celulară și semnalizarea reciprocă.

Urmează o fază de "sinteză activă" sau de "creștere logaritmică" care durează cca. 4 - 6 zile și în care se înregistrează creșterea constantă a titrului de anticorpi, urmată de o scurtă fază de stagnare și apoi de una de declin. Primii care apar sunt anticorpilor din clasa IgM, pentru ca după 2 - 3 zile să poată fi detectați și anticorpi din clasele IgG și IgA, al căror nivel este însă extrem de scăzut, dar care crește pe măsură ce titrul anticorpilor IgM începe să scadă. Creșterea populației de molecule IgG este asociată cu scăderea celor IgM care, după câteva săptămâni, dispar total din circulație.

Moleculele de imunoglobuline sintetizate după stimulul antigenic primar sunt extrem de eterogene, atât din punct de vedere al izotipului cât și din punct de vedere al afinității lor. La sfârșitul perioadei de stagnare și începutul celei de declin, în ser există molecule de anticorp din clasele IgM, IgG, IgA și eventual IgE. După ce au dispărut anticorpilor IgM, persistă, la un prag de concentrație foarte scăzut, clasele IgG și IgA, persistență care poate dura un timp variabil, de ordinul săptămânilor, anilor sau chiar toată viața. Persistența lor timp îndelungat este o dovadă a existenței în organism a unui număr mic de plasmocite care mai sintetizează anticorpi cu specificitatea respectivă.

Anticorpilor de răspuns primar au două caracteristici majore: aparțin predominant clasei IgM și au o afinitate pentru antigen extrem de diferită, deoarece fiecare clonă de limfocite B stimulată produce anticorpi cu o anumită afinitate. Afinitatea medie a populației de molecule de anticorp, la începutul răspunsului, scade către sfârșitul lui deoarece există o selecție pentru clonele de limfocite B cu cea mai bună afinitate pentru antigen. Răspunsul imun primar, instalat după un stimul antigenic unic, se caracterizează prin sinteza anticorpilor IgM cu afinitate mică



pentru antigen, dar cu aviditate mare. După 12- 16 zile, ei sunt înlocuiți cu anticorpi din clasa IgG a căror concentrație în ser se menține încă în limite foarte scăzute.

După un al doilea contact al organismului cu același antigen, se induce "răspunsul imun secundar", foarte diferit de cel primar (v. fig. 182). Acesta se caracterizează prin aceea că poate fi declanșat de către o cantitate mică de antigen, precum și prin faptul că anticorpii apar rapid, ating concentrații mari în ser, aparțin clasei IgG și au afinitate mare și aviditate mică pentru antigenul declanșator, deoarece au numai două situsuri combinate, spre deosebire de anticorpii IgM care au 10 situsuri.

Cel puțin două mecanisme sunt responsabile de aceste fenomene: a) existența limfocitelor *T* și *B* de memorie și b) cooperarea între limfocitele *T* și *B*, care este eficace și absolut indispensabilă pentru generarea anticorpilor din clasa IgG. Deci, diferențele dintre răspunsul imun primar și cel secundar sunt de ordin cantitativ și calitativ. Cele de ordin cantitativ se referă la cantitatea foarte mare de anticorpi sintetizați în cursul răspunsului imun secundar, sinteză care se menține un timp îndelungat în comparație cu sinteza "modestă" care are loc după stimulul antigenic primar. Cele de ordin "calitativ" se referă la clasele de imunoglobulină sintetizate: IgM după stimulul primar și IgG după cel secundar. Aceste caracteristici sunt general valabile pentru orice răspuns umoral (tabelul 99).

Tabelul 99

Caracteristicile răspunsului imun primar și secundar

Caracterul	Răspunsul imun	
	Primar	Secundar
Perioada de latență	Lungă	Scurtă
Rata de sinteză a anticorpilor	Lentă	Rapidă
Titrul anticorpilor	Scăzut	Crescut
Persistența anticorpilor	Scurtă	Lungă
Afinitatea anticorpilor	Scăzută	Mare
Prezența celulelor de memorie	Lipsește sau sunt foarte puține	Prezente în număr mare
Clasa anticorpilor	IgM	IgG
Doza de antigen necesară pentru declanșarea răspunsului	Mare	Mică

Există însă și unele variante particulare, când la al doilea stimul antigenic se înregistrează o persistență prelungită a anticorpilor IgM sau apariția precoce a celor IgG.

După stimulul antigenic secundar, antigenul este fagocitat de către celulele fagocitare sau este reținut de către cele dendritice din foliculii corticali ai ganglionilor limfatici și ai splinei. Reținerea lor la acest nivel este dependentă de prezența anticorpilor formați în cursul răspunsului imun primar. Urmează o perioadă de latență scurtă, cu o rată mai rapidă a sintezei și deci un titru ridicat al anticorpilor care persistă în circulație un timp îndelungat. Acum are loc conversia anticorpilor IgM, slab și tranzitoriu reprezentanți, spre anticorpi IgG cu o mare afinitate pentru antigen; dozele mici favorizează creșterea afinității, iar cele mari o



defavorizează. Explicația ipotetică a acestui fenomen ar fi următoarea: dozele mici de antigen ar selecta numai celulele care au receptori cu afinitate mare pentru el. Aceste celule vor fi primele care vor lega epitopii și care vor sintetiza anticorpi similari receptorilor lor, deci cu afinitate mare. În cazul unor doze mari, celulele cu afinitate mare sunt "saturate", excesul de antigen devenind accesibil și celor cu afinitate mică, astfel că anticorpii secretați vor fi cu afinitate diferită: mare și mică.

Toate acestea sunt valabile pentru antigenele timo-dependente. În cazul celor timo-independente, răspunsul primar este foarte slab, iar cel secundar, de asemenea redus ca intensitate, se caracterizează prin sinteza de anticorpi IgM și nu IgG. Aceste antigene, mult mai rezistente la enzimele lizozomale ale macrofagelor, au proprietăți de activatori policlonali și, ca atare, nu antrenează proliferarea celulelor de memorie aparținând unei singure clone, din care cauză răspunsul secundar seamănă, în privința intensității și clasei de anticorpi sintetizată, cu cel secundar.

În cazul antigenelor timo-dependente, anticorpii care mai persistă în circulație după stimulul primar dispar după al doilea stimul. Se instalează o "fază negativă", caracterizată prin absența totală a lor datorită formării de complexe antigen-anticorp, complexe care sunt eliminate în principal prin fagocitoză opsonică.

Reacțiile rapide și explozive care caracterizează răspunsul imun secundar sunt consecința "memoriei imunologice" instalată după prima întâlnire cu antigenul. Stimulul primar declanșează proliferarea clonală a limfocitelor *T* și *B* cu receptori specifici pentru antigenul în cauză; o parte dintre aceste celule vor evolua spre funcții efectoare, iar altă parte vor fi celule de memorie gata de intervenție în cazul unei noi agresuni din partea aceluiași antigen. Dacă această agresiune are loc, intensitatea reacțiilor de apărare este mult mai violentă, deoarece numărul celulelor care intră în acțiune este mult mai mare.

Existența celulelor de memorie a fost demonstrată experimental prin așa-zisul "efect de grupare purtătoare". După cum se știe, limfocitele *B* recunosc haptena (epitopul) iar cele *T*, gruparea purtătoare. Un semnal de la haptena și alt semnal de la limfocitul *T* vor activa celula *B* care va evolua spre plasmocit. Când unul dintre cele două semnale lipsește, activarea și evoluția acestei celule sunt imposibile. Cu ajutorul unor antigene artificiale sau sintetice, s-a demonstrat existența celulelor de memorie, folosindu-se în acest scop haptene de genul dinitrofenil (DNP) cuplate cu grupări de albumină serică bovină (BSA), albumină de ou de pasăre (ovalbumină sau OVA) etc. Atunci când animalele au fost imunizate primar și secundar cu complexul BSA-DNP, în ser au apărut anticorpi anti-DNP. După stimulul primar cu BSA-DNP și secundar cu OVA-DNP, sinteza anticorpilor anti-DNP a fost practic nulă. Când animalele au fost stimulate primar cu gruparea purtătoare OVA iar secundar cu complexul OVA-DNP, au sintetizat anticorpi anti-DNP, deși veniseră în contact pentru prima dată cu această haptena. Răspunsul imun a avut loc deoarece în organism erau celulele *T* de memorie pentru gruparea purtătoare, care la un nou stimul au "focalizat" eficient epitopul DNP spre receptorii limfocitelor *B*. Efectul "grupare purtătoare" este o dovadă experimentală serioasă care atestă existența celulelor de memorie pe de o parte și necesitatea cooperărilor celulare în răspunsul imun pe de altă parte. De asemenea, aceste experimente demonstrează rolul major al limfocitelor *T* în păstrarea memoriei imunologice.

Baza celulară a producției de anticorpi este transformarea limfocitelor *B* în plasmocite secretoare, transformare care se face ca urmare a efectului generat de către un semnal venit de la antigen și a interacțiunilor limfocitului *B* cu alte celule auxiliare și accesorii. Răspunsul limfocitelor *B* se realizează în trei etape distincte care corespund unor serii de semnale cu impact diferit asupra celulei stimulate. În prima etapă are loc "activarea" celulei *B* aflate în stare de repaus (faza



G<sub>0</sub>). Datorită creșterii activității metabolice, celula începe să se mărească în volum și să își exprime activ, pe suprafața sa, moleculele de clasa a II-a MHC, moleculele CD23 și receptorii pentru diferite citokine, căpătând în același timp și proprietăți de celulă APC. Semnalul principal îl primește de la antigen prin imunoglobulinele de membrană din clasele IgM/IgD care au funcție de receptori pentru antigen. Exprimarea ulterioară a receptorilor pentru citokine o face capabilă să primească mesaje secundare de la diferite molecule secretate de către celulele ajutătoare sau accesorii, care vor controla evoluția metabolismului intracelular al fosfatidilinozitolilor declanșată după stimul de către activarea fosfolipazei C, creșterea intracitosolică a  $Ca^{2+}$  și activarea proteinkinazei C. În această etapă, limfocitul B competent devine sensibil la alte semnale care vor controla etapa a 2-a "proliferativă" și a 3-a de "diferențiere". Proliferarea este o etapă relativ scurtă, urmată de diferențierea terminală care se traduce prin creșterea exprimării genelor care controlează sinteza lanțurilor L, H și J ale moleculei de imunoglobulină și prin creșterea ARNm. Semnalul primit în faza inițială din partea antigenului și recepționat prin receptorii pentru antigen de pe suprafața celulei este specific; semnalele ulterioare, primite prin contact direct cu alte celule sau prin diverse citokine sunt nespecifice, în sensul că ele operează în aceeași manieră asupra tuturor clonelor de celule B, indiferent de specificitatea de recunoaștere a anticorpilor care vor fi secretați de către celulă. Antigenul poate stimula direct limfocitul B, fără a fi necesară intervenția celulelor prezentatoare, cum este cazul antigenelor timoindependente. Celulele prezentatoare însă "focalizează" și prezintă antigenul limfocitelor T prin contact direct sub restricția moleculelor de clasa a II-a MHC. De fapt, limfocitul B activat concentrează specific antigenul pe suprafața sa, mai ales sub formă de peptide care vor fi prezentate la rândul lor celulelor T. Acestea recunosc peptidele derivate din moleculele prezentate de către ele limfocitelor B în asociere cu moleculele MHC și sunt la rândul lor activate în vederea sintezei unor citokine. În felul acesta se stabilește o interacție activatoare între T și B, cu stimulare reciprocă. Limfocitele B sunt stimulate direct de către celulele T prin intermediul moleculelor MHC de clasa II, iar cele T primesc prin peptidele antigenului semnale activatoare pentru producerea de citokine care vor continua stimularea clonelor B activate (fig. 183 A și B).

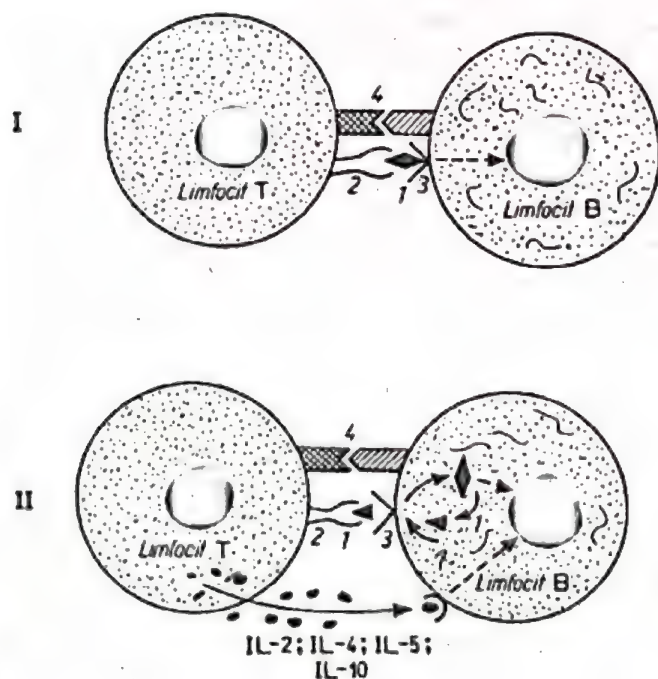


Fig.183 A. Model ipotetic care încearcă explicarea mecanismelor de activare a limfocitelor B în cooperare cu limfocitele Th ( $CD4^+$ ).

I. Limfocitul T prezintă antigenul (1) limfocitelor B. Acesta este fixat specific la receptorul pentru antigen de pe T(2) și recunoscut de receptorul de pe B (3), sub restricție MHC (4).

II. Limfocitul B prelucrează antigenul, prezentând peptida antigenică (1), fixată la receptorul de natură imunoglobulinică (3), limfocitului T(2) sub restricție MHC (4).  $CD4^+$  activat, sintetizează limfokine (IL-2, IL-4 etc.) care vor activa celula B în absența contactului direct cu T. Receptorii pentru antigen de natură imunoglobulinică de la nivelul celulei B, receptori din clasa IgM, fixează și rețin antigenul atunci când acesta este în concentrații slabe, prezentându-l limfocitelor T care, odată activate, vor produce limfokine activatoare pentru B.

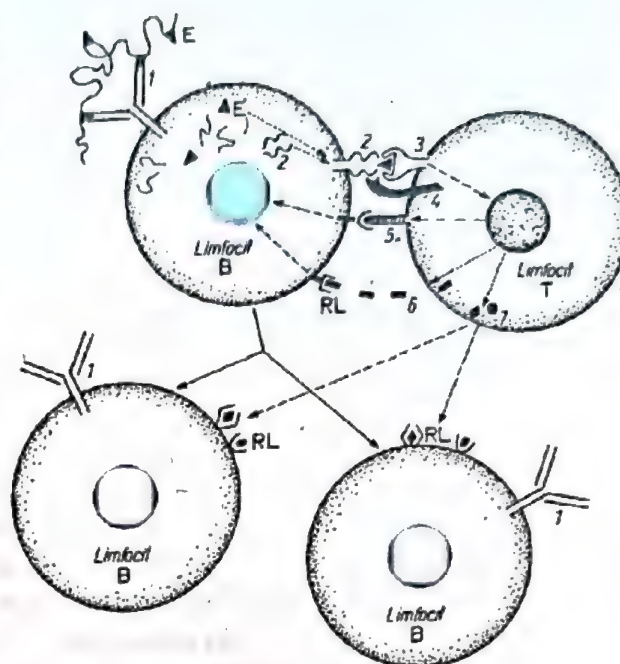


Fig.183 B. Date recente referitoare la cooperarea limfocitelor T și B.

Limfocitul B recunoaște epitopul (E) prin receptorul pentru antigen de natură imunoglobulinică (1). După internalizare și prelucrare, E este asociat moleculelor MHC de clasa II (2) și reexprimat pe membrana plasmatică, fiind recunoscut de către limfocitul T prin TCR (3) sub restricție MHC (4).

Antigenul astfel recunoscut transmite semnale spre nucleul limfocitului T care vor stimula exprimarea pe membrana acestuia a unui ligand (5) și secreția de limfokine (6,7) recunoscute la rândul lor de către B prin receptori de membrană pentru ele (RL).

În urma acestui proces, se transmit semnale activatoare spre nucleul celulei B care se divide, exprimând receptori pentru unele citokine secretate de către limfocitul T activat (7) care vor controla proliferarea, diferențierea, secreția și comutarea claselor de imunoglobuline (adaptare după P.D. Hodgkin și M.R. Kehry).



.....→ Procese de sinteză sau translocare

————→ Procese de exprimare a unor antigene sau de proliferare și diferențiere celulară.

-----→ Procese de stimulare și activare.

Prin examinări minuțioase la microscopul electronic s-a observat că, în timpul contactului T-B, limfocitele T își orientează polul secretor către B, fapt care permite realizarea unei concentrații mari de citokine în apropierea membranei acesteia. De altfel, asemenea concentrații de molecule, cu efecte biologice bine definite la polul celulei care vine în contact cu ținta, au fost semnalate și în cazul celulelor citotoxice Tc și NK. Practic, asupra limfocitelor B acționează majoritatea limfokinelor secretate de către limfocitele T: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 etc. Interleukina-2 și IFN- $\gamma$  au efecte stimulatorie; IL-4 acționează precoce pentru a controla căpătarea competenței și posibilitatea prezentării antigenului de către celula B prin mărirea densității moleculelor de clasa a II-a MHC, și tardiv, când intervine în comutarea sintezei claselor de imunoglobuline; IL-5 se pare că ar avea rol în comutarea sintezei IgM spre IgA, iar IL-6 este un factor care intervine numai după ce limfocitul B a primit ajutor de la T, acționând ca factor tardiv de diferențiere. În faza de repaus, limfocitul B exprimă pe suprafața membranei imunoglobuline din clasele IgM și IgD. După stimul, pierde receptorii IgD și începe sinteza IgM, pentru ca în fazele ulterioare să intervină fenomenul de "comutare" a sintezei: o parte din celule înlocuiesc receptorii IgM cu receptori IgG și devin plasmocite producătoare de molecule IgG. Comutarea claselor de imunoglobuline este controlată de către citokine. De exemplu, IL-4 este factorul esențial care realizează comutarea de la clasa IgM la IgE, pe când IFN $\gamma$  este inhibitorul acestei comutări.

În linii mari, sinteza anticorpilor IgM de răspuns primar poate avea loc și în absența cooperărilor celulei B cu alte celule sau molecule, antigenele timo-independente – după cum spuneam anterior – fiind molecule mari care au și pro-



prietatea de a stimula policlonal, putând genera o asemenea sinteză. Spre deosebire de IgM, sinteza anticorpilor IgG este strict dependentă de intervenția celulelor T și de instalarea memoriei imunologice.

*Răspunsul imun mediat celular* recunoaște aceleași principii fundamentale ale imunității, și anume: instalarea memoriei imunologice după stimulul primar și reacții intense și rapide după al doilea contact cu antigenul responsabil de stimularea primară.

De exemplu, dacă unui șoarece (A) i se grefează un fragment de piele prelevat de la alt șoarece (B), șoarecele A recunoaște grefa ca străină și o elimină în 2 - 3 săptămâni. După rejecție, este grefat cu piele recoltată de la șoarecele C, străin - din punct de vedere al antigenelor de histocompatibilitate - atât de șoarecele A cât și de șoarecele B; rejecția are loc tot după 2 - 3 săptămâni. Dacă însă este grefat din nou cu piele recoltată tot de la șoarecele B, rejecția se face în decurs de 5 - 6 zile. Același lucru se observă și la o nouă grefare cu pielea șoarecelui C. Deci, prima grefă a stimulat antigenic gazda A ale cărei limfocite T au păstrat memoria contactului primar, dezvoltând la a doua întâlnire cu același antigen reacții imune de tip secundar, mult mai rapide și mai intense. Așadar, principiul de bază al imunității, acela de recunoaștere specifică și de păstrare a memoriei imunologice a contactului cu antigenul, este respectat, cu deosebirea că în răspunsul imun mediat celular nu are loc activarea sintezei anticorpilor, ci proliferarea clonală și intervenția directă a celulelor efectoare citotoxice.

O altă deosebire între cele două mecanisme de bază ale imunității este dată de către tipul populației de celule efectoare implicate: în răspunsul imun mediat umoral rolul major revine unei singure celule efectoare, limfocitul B, care secretă imunoglobuline, pe când în cel mediat celular pot interveni mai multe tipuri de celule, cum ar fi limfocitele T citotoxice, celulele NK, celulele K, macrofagele etc.

Existența limfocitelor Tc poate fi pusă în evidență - în afară de metoda rejecției grefelor de organe și țesuturi practică *in vivo* la animalele de laborator - și *in vitro*, prin culturi mixte limfocitare. În acest caz, limfocitele subiectului A sunt cultivate *in vitro* cu cele ale subiectului B, diferite alogenic de A și blocate în prealabil prin tratare cu mitomicină C sau prin iradiere (pentru a se păstra proprietățile lor stimulante și a se bloca capacitatea proliferativă). În decurs de 4 - 5 zile, limfocitele subiectului A, stimulate de cele B, proliferază și devin citotoxice pentru B. Efectul lor citotoxic poate fi evidențiat cu ajutorul celulelor țintă B marcate cu  $^{51}\text{Cr}$ . Cu cât cantitatea de  $^{51}\text{Cr}$  eliberată în mediu va fi mai mare, cu atât citoliza va fi mai intensă. Limfocitele Tc sunt  $\text{CD8}^+$  cu antigenul CD2 termolabil și recunosc antigenul sub restricția moleculelor de clasa I MHC. De regulă, epitopii recunoscuți de către Tc sunt peptide scurte, de 14 - 15 reziduuri de aminoacizi, care se leagă la moleculele HLA de clasa I. În absența stimulului antigenic, limfocitele Tc circulă sub formă de celule precursorare. După contactul cu antigenul, încep activarea, proliferarea și diferențierea precursorilor în celule efectoare citotoxice.

Practic, există două etape diferite: a) etapa de diferențiere a precursorilor în celule efectoare și b) etapa de activare a citolizei propriu-zise.

Diferențierea are loc ca urmare a semnalelor activatoare primite de la antigen și a semnalelor accesorii primite de la IL-1, IL-2, IL-4 și IL-6. Sunt activate fosfolipidele de membrană, încep metabolismul inozitolfosfaților și activarea circulației  $\text{Ca}^{2+}$ , activarea PKC, sinteza ARNm, a receptorilor pentru IL-2, sinteza TNF,  $\text{IFN}\gamma$  și a granulelor citolitice. Citoplasma acestor celule este bogată în astfel de granule care conțin proteoglicani și diferite enzime.



Linfocitele efectoare *Tc* recunosc antigenul asociat cu moleculele MHC de clasa I de pe celulele țintă prin complexul receptor-CD3 care va transmite semnale de activare (în special prin fosfolipaza C) ce vor activa cascada de evenimente intracelulare, finalizată cu producerea și eliberarea granulelor citolitice.

În afară de limfocitele *Tc* care distrug ținta sub restricție MHC, citotoxicitatea mediată celular mai poate fi efectuată și de către celulele *K* efectoare ale citotoxicității mediate celular anticorp-dependentă, de *NK*, *LAK* sau de către monocite și macrofage. Celulele *NK* pot ucide linii celulare care nu exprimă deloc sau exprimă un număr foarte mic de molecule de clasa I MHC, posedând în acest scop receptori multipli și folosind diferite strategii de recunoaștere. Ele ar fi lipsite de receptori pentru recunoașterea antigenelor MHC. Mai mult, prezența în număr mare a moleculelor MHC pe celulele țintă chiar ar inhiba recunoașterea și liza acestora de către *NK* (fig. 184).

Datele sunt însă discutabile, deoarece s-a constatat că există celule țintă care, deși nu diferă între ele în ce privește nivelul exprimării moleculelor de clasa I MHC, diferă în susceptibilitatea lor față de citotoxicitatea *NK*, de unde concluzia că ar mai interveni și alți factori celulari care ar influența funcțiile citolitice ale acestor celule efectoare.

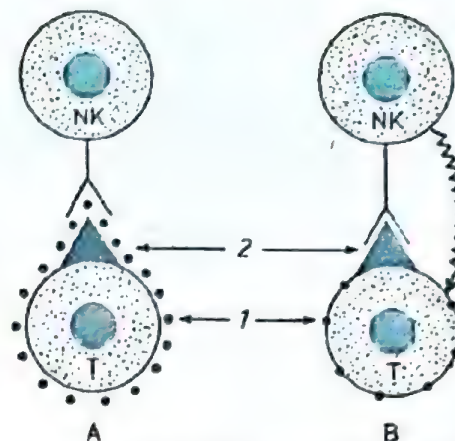


Fig.184. Modalitate posibilă de inhibiție a activității citotoxice a celulelor *NK* de către moleculele MHC (1) exprimate abundant pe membrana celulelor țintă (T).

A. Moleculele MHC (1) "maschează" ligandul (2) de pe țintă, celula *NK* fiind în imposibilitate de a-l recunoaște.

B. Ligandul (2) este recunoscut, proces care activează mecanismele litice *NK* (după L. Moretta și col.).

## MECANISMELE EFECTOARE CARE INTERVIN ÎN NEUTRALIZAREA ANTIGENULUI

Mecanismele efectoare ale imunității mediate prin anticorpi sunt cel mai bine cunoscute. Există două modalități majore de acțiune: una în care anticorpul se combină cu antigenul și îi anulează starea sa de moleculă aflată liberă în umorile organismului, și alta în care anticorpii se fixează la antigen dar, pentru neutralizarea acestuia, este necesară intervenția complementului.

Prima situație este operantă numai în cazul antigenelor moleculare și corpusculare de genul toxinelor bacteriene, virusurilor sau bacteriilor. Acestea sunt neutralizate prin precipitare sau aglutinare, fiind "scoase" din soluție sau suspensie și eliminate prin fagocitoză opsonică sau prin filtrul renal. Acest gen de neutralizare prin anticorpi este rapid și eficient, în special în cazul toxinelor și al infecțiilor virale, fiind condiționat bineînțeles de către numărul moleculelor de anticorp aflate în circulație.

Neutralizarea prin anticorpi a antigenelor complex organizate sub formă de celule sau țesuturi se realizează pe cale citotoxică prin activarea componentelor complementului. Anticorpii se fixează la antigenele de pe suprafața celulei și, odată fixați, își descoperă situsul de activare a complementului de la nivelul



domeniului C<sub>H2</sub> al fragmentului Fc care va implanta componentele C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub> și C<sub>9</sub> în dublul strat lipidic al membranei celulei țintă, formând "pori" care vor altera ireversibil condiția fiziologică a acesteia. Procesul este cunoscut sub denumirea de citotoxicitate sau liză "complement-dependentă" și este foarte ușor de pus în evidență *in vitro* prin reacții de hemoliză. Mecanisme de acest gen sunt generate *in vivo* în cazul bolii hemolitice a nou-născutului sau în erori de transfuzie, când se inoculează sânge aparținând unor grupe ABO necorespunzătoare.

Un alt mecanism efector dependent de anticorpi este citotoxicitatea mediată celular anticorp-dependentă. În acest mecanism, neutralizarea țintei este realizată de către celula ucigașă, dar activarea ei se face numai în condiția legării celulei efectoare la celula țintă prin intermediul moleculei de anticorp. Moleculele de anticorp din clasa IgE dețin un rol important în declanșarea unor mecanisme particulare de apărare, care constau din activarea eliberării de către mastocite și bazofile a unor granule bogate în histamină și serotonină care declanșează reacții inflamatorii generatoare de disconfort pentru paraziți și bacterii, dar și pentru organism, cunoscute sub denumirea de reacții alergice sau de hipersensibilitate de tip imediat.

Mecanismele citotoxicității mediate celular se pare că sunt identice, indiferent de tipul de celulă efectoare. La toate ar fi mai multe etape care, în linii mari, constau din formarea de conjugate, de comuniuni între celule efectoare și celula țintă, urmată de migrarea granulelor citolitice din citoplasma celulelor citotoxice spre locul de contact cu celula țintă, secreția acestor granule în exterior, formarea de pori în membrana țintei și fragmentarea nucleului ei. După distrugerea țintei, celulele ucigașe se desprind, fiind pregătite să recunoască și să ucidă alte celule țintă. Legarea efectoarelor Tc sau NK la celula care urmează să fie ucisă durează cca. 2-3 minute și necesită prezența moleculelor de adeziune și a Mg<sup>2+</sup>, procesul fiind strict dependent de prezența acestor ioni. După legare, aparatul Golgi al celulelor ucigașe se orientează rapid spre celula țintă și începe migrarea granulelor citolitice către zona de contact, granule preformate la NK, sau care încep să se formeze în endozomi la limfocitele Tc după stimularea acestora de către țintă. Urmează exocitoza lor și liza celulară ca urmare a apariției unor leziuni în membrana țintei, de formă tubulară, cu diametrul variind între 5 și 20 nm. La microscopul electronic granulele apar ca niște formațiuni corpusculare dense, care pot fi separate prin centrifugare în gradient de densitate. Au un perete exterior format dintr-un dublu strat lipidic și își păstrează capacitatea litică și după separare. De fapt, ele reprezintă o familie de șase serinesteraze denumite "granzime" A.F. și de "perforine" sau "citolizine", proteine formatoare de "pori" cu diametre variabile, care au o greutate moleculară de 70 kD și care sunt foarte asemănătoare cu componenta C<sub>9</sub> a complementului. Au două domenii bogate în Cys, dintre care unul este implicat în legarea Ca<sup>2+</sup>, prin intermediul căruia reacționează cu o grupare fosforilcolinică a fosfolipidelor de membrană. Prin această asociere, perforinele suferă modificări conformaționale care duc la polimerizarea lor în dublul strat lipidic și la formarea de "pori" în membrana țintei, niște canale permeabile pentru moleculele cu diametru mai mic de 9 nm. Pentru formarea unui por trebuie cel puțin 3-4 monomeri de perforine. În acest proces sunt mai multe stadii funcționale (fig. 185).

Polimerizarea perforinelor monomer este dependentă de prezența Ca<sup>2+</sup>, dar uciderea ulterioară a celulei este independentă de prezența acestor ioni. Formarea porilor este urmată de creșterea presiunii osmotice în interiorul celulei țintă, datorită părăsirii ei de către ioni și de proteinele cu greutate moleculară mică.



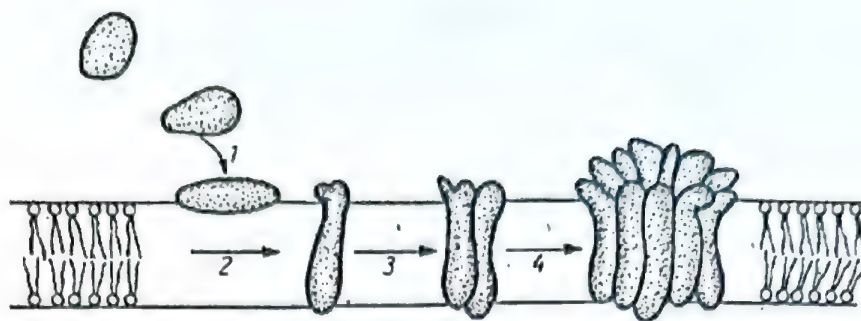


Fig.185. Secvența momentelor care au loc în cursul formării porilor în membrana celulei țintă sub acțiunea perforinelor.

Perforina monomer se leagă la membrana celulară (1). După legare suferă modificări conformaționale (2), agregă în poliperforine (3) formând pori cu diametrul de 5–20 de nm (4) (după D.M. Ojcius și col.).

În celulă, rămân numai moleculele cu greutate moleculară mare care, în urma influxului de molecule de apă, duc la umflarea și ruperea ei.

În afară de perforine și granzime, granulele mai conțin enzime lizozomale (fosfatază acidă, arilsulfatază) și proteoglicani, molecule cu greutate moleculară mare care interacționează fizic cu perforinele și granzimele, dar care nu ar avea rol în uciderea țintei.

Din celulele Tc a fost izolată "leukoalexina", o proteină de 50 kD similară factorului de necroză a tumorilor și limfotoxinelor, care ar fi citotoxică pentru celulele tumorale. Leukoalexina, factorul de necroză și limfotoxinele pot ucide ținta în absența  $Ca^{2+}$ .

Și celula țintă joacă un rol activ în propria ei moarte. După "lezare", sunt activate nucleazele endogene ale acesteia, un adevărat program sinucigaș care conduce la fragmentarea ADN și la moartea celulei. De altfel, fragmentarea ADN este o altă cale esențială de citoliză.

În citosolul celulei citotoxice există citotoxine similare factorului de necroză a tumorilor, activate de serin-esteraze care, odată ajunsă în spațiul extracelular, fie că se fixează la receptori specifici de pe membrana plasmatică a țintei, după care sunt internalizați într-o manieră similară fagocitozei opsonice, fie că vor traversa membrana celulară direct și, odată ajunse în citosol, vor transmite semnale ucigașe spre nucleul celulei țintă. Este interesant faptul că perforinele și granzimele perforează membrana celulei străine, dar nu au nici un efect distructiv asupra membranei celulei care a eliberat acești factori. Se pare că celulele ucigașe nu sunt susceptibile la acțiunea litică a acestor granule, datorită existenței unor mecanisme specifice de protecție reprezentate de niște proteine care ar conferi o mare rezistență la acțiunea distructivă a perforinelor. Aceste proteine protectoare, denumite "protectine", ar fi plasate la suprafața externă a membranei plasmatice și ar inactiva spontan perforinele, făcând imposibilă inserarea acestora în dublul strat lipidic al membranei celulare. Protectinele sunt foarte active, o singură moleculă putând conferi rezistență celulei (fig. 186).

Liza celulei de către efectoarele citotoxice se realizează prin formarea de pori și fragmentarea nucleului. Dar și componentele complementului, activate pe cale clasică sau alternativă, ucid celula țintă tot prin formare de pori. În ambele mecanisme, formarea porilor este practic identică, ea implicând adăugarea secvențială de molecule individuale de proteină la o leziune inițială, de unde concluzia că nu pot fi trasate delimitări categorice între diferite forme ale apărării imune.



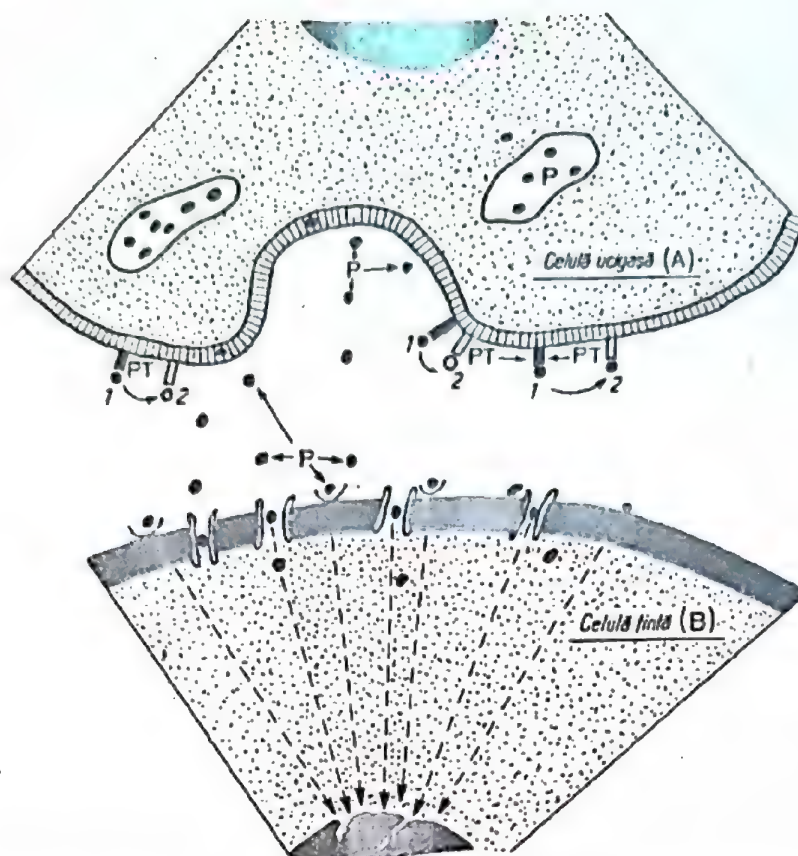


Fig.186. Eliminarea prin exocitoză a perforinelor de către celula ucigașă (A) și acțiunea acestora asupra celulei țintă (B).

Perforinele (P) formează pori în membrana plasmatică sau se fixează la receptori pentru ele, transmitând semnale distructive către nucleul celulei țintă.

Celula ucigașă A este protejată de efectul distructiv al acestora prin intermediul protectinelor (PT), care transformă perforinele din fază activă (1) în fază inactivă, netoxică (2) pentru celule (după A. Zychlinsky și col.)

## ÎNCERCĂRI DE UTILIZARE PRACTICĂ A UNOR EFECTORI AI IMUNITĂȚII

Primii efectori ai imunității folosiți deliberat în practică au fost anticorpilor, iar scopul utilizării lor ținea anularea efectelor unor agresiuni virale sau bacteriene. Era și firesc ca la sfârșitul secolului trecut și începutul acestui secol, când bolile infecto-contagioase constituiau o problemă de importanță primordială pentru sănătatea publică, preocupările să fie orientate în direcția combaterii acestora. Alături de vaccinuri, seroterapia a dat bune rezultate în multe boli, constituind un instrument terapeutic foarte valoros. Cu timpul, utilizarea anticorpilor a fost extinsă, fiind aplicată în medicina legală, în prevenirea anemiei hemolitice a nou-născutului, în diagnosticul de laborator etc. Efectorii imunității mediate celular au fost cunoscuți mai târziu și, ca atare, utilizarea lor practică a fost mai tardivă.

În zilele noastre, bolile infecto-contagioase, cu mici excepții, nu mai constituie o problemă majoră de sănătate. În schimb, imunodeficiențele, bolile cronice și în special cele neoplazice, sunt într-o ascendență neîntreruptă. De aceea, cercetările actuale sunt orientate spre găsirea celor mai eficiente căi de aplicare a cunoștințelor de imunologie fundamentală în combaterea lor.

Există două direcții principale de interes: încercările de utilizare a anticorpilor sub formă de imunotoxine și a celor stimulate *in vitro* cu antigene tumorale pentru a deveni limfocite ucigașe activate (LAK) care să distrugă eficient tumorile *in vivo*.

## IMUNOTOXINELE

Imunotoxinele sunt molecule complexe formate din anticorpi IgG cu specificitate de anticorpi față de unii determinanți antigenici existenți pe suprafața celulelor tumorale, la care au fost atașați diferiți factori toxici. Aceste molecule de imunoglobulină "purtoare" de agenți distructivi au generat numeroase speranțe și au antrenat multe colective de cercetare în activitatea de obținere a lor și de evaluare a efectului lor terapeutic. Imunotoxinele sunt toxine active, conjugate cu anticorpi care "văd" antigenele de pe suprafața unor celule tumorale sau normale. Uneori, în loc de toxine, se cuplează la anticorpi unii izotopi puternic radioactivi. Principiul acestei metode terapeutice este acela de asociere a specificității anticorpului cu nocivitatea toxinei sau izotopului, adică folosirea anticorpului ca purtător de factor ucigaș. Anticorpul se va lega prin *Fab* la antigenul de pe suprafața celulei pe care-l va recunoaște specific, menținând în contact strâns cu celula țintă "povara" ucigașă. Deci, imunotoxina este un fel de "obuz teleghidat" care duce explozibilul direct la țintă, pătrunde în citosol și inactivează componentele mașinării de sinteză a proteinelor.

Primul care a imaginat un astfel de procedeu terapeutic a fost P.EHRLICH. Acesta a propus crearea de "gloanțe magice" ("zauberkugeln") care să fie orientate spre ținte precise, ținte care în mod natural, cum ar fi cazul celulelor tumorale, sunt recunoscute de către un număr mic de molecule de anticorp și nu exprimă sau exprimă foarte puține antigene specific tumorale.

S-a încercat folosirea anticorpilor monoclonali la care s-au legat toxine de origine bacteriană sau toxine vegetale, ca de pildă toxina difterică, toxina de *Ps. aeruginosa* (exotoxina A), de *Shigella*, toxina de ricin etc. Toxinele din plante se leagă la glicoproteine și glicolipide care au galactoză terminal. Majoritatea sunt alcătuite din câte două lanțuri polipeptidice, A și B, distincte funcțional și legate între ele prin legături disulfidice. De regulă polipeptidul A este toxic, având activitate enzimatică, iar B se leagă la receptorii de pe suprafața celulei, niște glicoproteine sau glicolipide al căror reziduu terminal este galactoză.

În practică, se izolează polipeptidul A și se leagă la anticorpul monoclonal prin legături disulfidice (fig. 187), după ce în prealabil toxinele de origine vegetală au fost deglicozilate în vederea eliminării manozei pe care o conțin. În caz contrar, manoză din componența lor s-ar lega la receptorii pentru manoză de pe celulele sistemului reticulo-endotelial și imunotoxina nu ar mai ajunge la țintă. În general, imunotoxinele acționează fie direct asupra ribozomilor inactivându-i, cum este cazul celor obținute cu toxina de ricin sau cu alte toxine vegetale, fie prin inactivarea unor enzime necesare translocării lanțului polipeptidic de la nivelul ribozomilor, cum este cazul exotoxinelor difterică sau piocianică.

Efectul lor depinde de modul de fixare la suprafața celulei. După datașare, este obligatorie endocitoza complexului și transportul spre endozom și aparatul Golgi. Când traversează membrana de la exterior spre interiorul celulei, fragmentul B al toxinei de ricin rămâne atașat la receptor, iar fragmentul A se desfășoară parțial (la pH acid), pătrunde în citosol unde pH-ul este neutru, se reînfrășoară și își



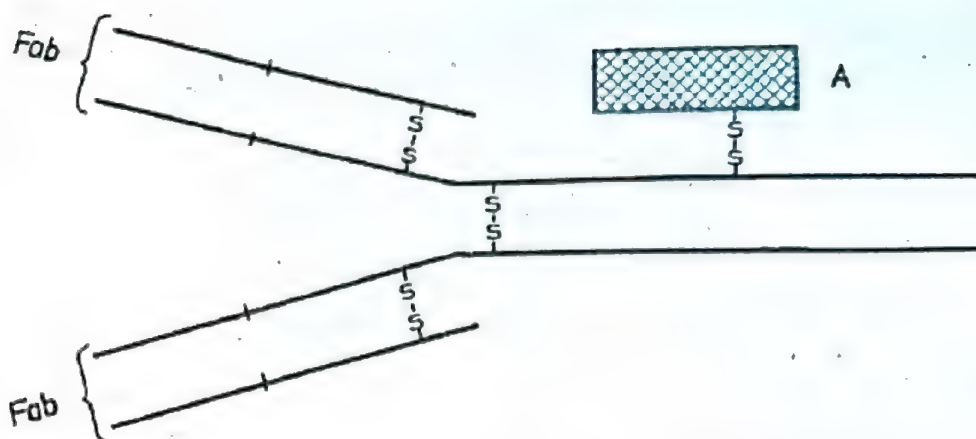


Fig.187. Principiul realizării unei molecule de "imunotoxină". Polipeptidul A din toxina de ricin este atașat prin legături disulfidice la molecula de anticorp IgG. Prin Fab, anticorpul se fixează specific la țintă, aducând astfel toxina în apropierea celulei sau chiar pe suprafața ei (după S. Olsness și col.).

recapătă proprietățile toxice (fig. 188). Nu întotdeauna este necesară existența pH-ului acid pentru ca toxina să poată pătrunde în celulă, uneori formându-se canale cationice în membrană care contribuie la alterarea stării funcționale a acesteia.

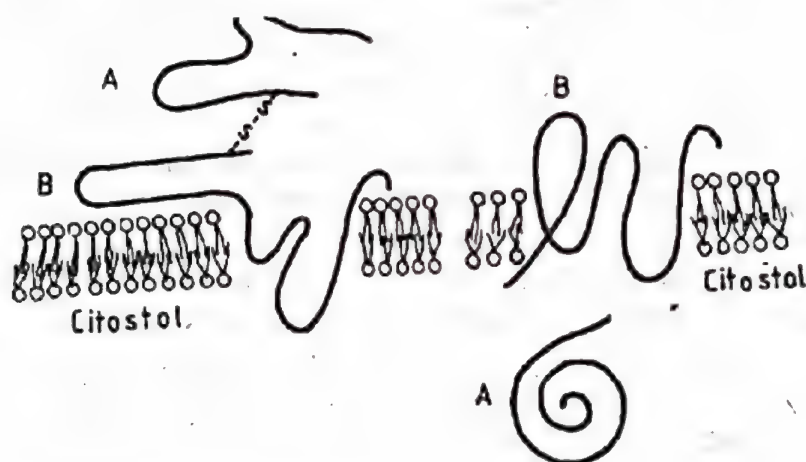
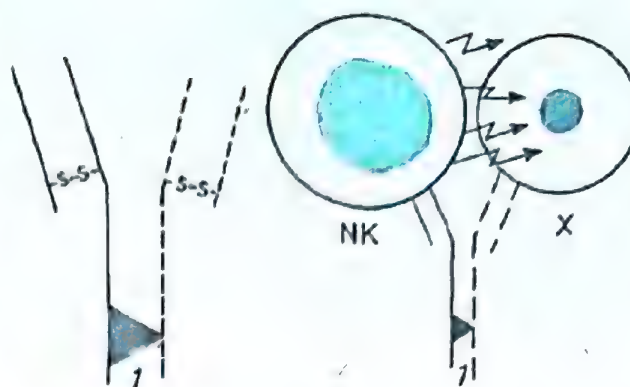


Fig.188. Modul de pătrundere a toxinei diferite intracitoplasmatic. Fragmentul B se inseră la membrana celulară iar fragmentul A se desfășoară, pătrunde în citoplasmă unde se reînfășoară, recăpătându-și proprietățile toxice care duc la formarea de pori și canale selective pentru ioni și, în final, la uciderea celulei țintă (după S. Olsness și col.).

Unele toxine au fost legate la hormoni, la IL-2, la CD4 care leagă gp 120 de pe celulele infectate cu HIV etc. Alte metode folosesc "anticorpi hibridi" care "văd", prin situsurile lor combinate, determinanții antigenici de pe celulele țintă și de pe celulele citotoxice NK sau Tc. Legarea celor două jumătăți de moleculă de imunoglobulină se poate face cu proteina A stafilococică, realizându-se o moleculă cu două specificități de recunoaștere care poate fixa și ține strâns apropiat celula ucigașă de victima ei (fig. 189).

Fig.189. Principiul formării unei molecule "hibrid" de anticorp. Molecula are două situsuri combinate cu specificități de recunoaștere diferite; un situs recunoaște celula NK (linia continuă), iar altul epitopii de pe celula țintă X (linia discontinuă). Cele două jumătăți de moleculă IgG cu specificități de recunoaștere diferite sunt legate între ele prin proteina A stafilococică (1). Se realizează o moleculă IgG capabilă să recunoască epitopii NK și epitopii celulei tumorale care menține celula ucigașă în imediata vecinătate a celei tumorale.



Folosirea imunotoxinelor nu a dat rezultate clare, deoarece necesită unele condiții care nu întotdeauna pot fi respectate în totalitate. Astfel, pentru a fi active, imunotoxinele trebuie să rămână un timp în circulație, fapt greu de realizat deoarece multe dintre ele sunt eliminate prin fagocitoză opsonică. Ele trebuie să pătrundă prin capilare în tumori, trebuie să fie internalizate de către celulele țintă pentru a ajunge la endozomi etc. Practic toate imunotoxinele sunt imunogene, așa că utilizarea lor repetată stimulează sinteza anticorpilor care vor neutraliza însăși prezența lor, motiv pentru care administrarea lor este limitată la 1-2 săptămâni. În afară de încercările de utilizare a lor pentru distrugerea celulelor tumorale, imunotoxinele au mai fost folosite în încercarea de distrugere a limfocitelor *T* în cazul unor boli autoimune, cu scopul realizării eliminării clonelor autoreactive, a limfocitelor *B* care produc acetilcolină (în *miastenia gravis*), a mastocitelor și bazofilelor (folosindu-se IgE la care s-au legat toxine), în alergii, pentru distrugerea unor paraziți etc. Dar, pe cât de frumoasă și atrăgătoare pare problema privită exclusiv teoretic, pe atât de spinoasă și plină de capcane devine atunci când se aplică practic.

#### ÎNCERCĂRI DE UTILIZARE PRACTICĂ A CELULELOR LAK

Teoretic, a fost emisă ipoteza că distrugerea *in vivo* a unei tumori imunogene poate duce la imunizarea organismului ca rezultat al instalării unui răspuns imun antitumoral dependent de limfocitele *T*.

Plecându-se de la această idee, s-a încercat stimularea specifică a limfocitelor *Tc in vitro* și reintroducerea lor în număr mare *in vivo*, la pacientul de la care a fost prelevată tumora și limfocitele supuse cultivării. Deoarece limfocitele *T* nu pot fi cultivate timp îndelungat *in vitro*, s-a recurs la ajutorarea lor cu IL-2 care să stimuleze exprimarea receptorilor pentru IL-2 și implicit multiplicarea.

Pe scurt, de la un pacient care urmează a fi supus terapiei, se recoltează limfocite *T* și un fragment de țesut tumoral. Limfocitele sunt cultivate *in vitro* mai multe săptămâni, în mediul de cultură în care se găsește antigenul tumoral (tumora prelucrată în mod adecvat, pentru a fi adusă până la forma de molecule libere de antigen) și în care se adaugă IL-2 exogenă. Limfocitele proliferate sub influența stimulului antigenic devin "celule ucigașe activate cu limfokine" (lymphokine activated killer cells) sau LAK, capabile să lizeze linia tumorală care este insensibilă la activitatea NK. Celulele devenite LAK sunt reinoculate pacientului care, desigur, nu le va respinge deoarece îi aparțin și care, teoretic, ar trebui să lizeze tumora deoarece au fost stimulate antigenic și au proliferat sub influența acesteia.



La unii pacienți cu melanom sau cu cancere renale metastazate, au fost obținute rezultate încurajatoare. Dar, la alți pacienți, ca de pildă la cei cu cancer de sân sau cu carcinom de colon, s-au obținut rezultate neconcludente, de multe ori efecte toxice, unii dintre ei dovedindu-se refractari la această terapie *in vivo*, deși *in vitro* tumorile lor erau susceptibile la acțiunea litică a celulelor LAK. Se pare că *in vivo* celulele LAK și IL2 sunt mai eficiente atunci când tumorile sunt mai imunogene și puternic infiltrate de către limfocite  $CD3^+$ , dar nu de  $CD3^+CD16^+$ , adică atunci când ele sunt infiltrate de limfocite T și nu de celule NK. Aceasta sugerează că celulele LAK, distrugând tumora *in vivo*, contribuie la eliberarea de antigene tumorale care ar continua stimularea antigenică a organismului. De aceea un răspuns clinic pozitiv poate avea loc numai atunci când în organismul pacienților este prezent antigenul tumoral care stimulează clonal limfocitele T imediat după inocularea celulelor LAK și a IL-2. Acolo unde antigenele tumorale lipsesc, rezultatele sunt negative.

Problema este însă mult mai complexă și cu multe necunoscute, fapt care face ca această concepție terapeutică să nu dea rezultatele scontate. Desigur că în acest proces intervin încă mulți factori care sunt total necunoscuți în momentul de față și a căror existență poate că încă nici nu o bănuim.

## MECANISME DE REGLARE A RĂSPUNSULUI IMUN

Răspunsul imun este expresia unor modificări reversibile provocate de intervenția unui stimul exogen sau endogen. De regulă, acest stimul este generat de către antigen, care deține rolul principal, dar nu unic, în declanșarea reacțiilor de apărare. El este doar "primul impuls" care "tulbură liniștea" efectorilor imunității, antrenând activări sau inhibări funcționale ca urmare a implicării diferiților mesageri moleculari sau celulari care vor genera stimuli adiționali cu rol în dirijarea funcțiilor imune în general și în controlul acestor funcții în special. De exemplu, după un stimul antigenic primar, începe proliferarea clonei limfocitelor *B* și transformarea lor în plasmocite, care vor sintetiza molecule de anticorp din clasa IgM ce vor recunoaște specific determinantul antigenic incriminat. Ca urmare a acestei situații, în organism vor exista un număr crescut de limfocite *B* și un prag ridicat al anticorpilor IGM care recunosc specific antigenul declanșator.

După un anumit timp, numărul plasmocitelor și titrul anticorpilor scad, valorile revenind la limitele existente anterior stimulului. Această revenire la normal este consecința intervenției unor mecanisme de reglare. În absența lor, procesul reacțional ar continua nestingherit, antrenând modificări biologice profunde, incompatibile cu viața.

Să admitem, de pildă, că un epitop stimulează o celulă *B* care are receptori pentru el și că, în tot organismul, clona destinată recunoașterii acestui epitop este formată dintr-o singură celulă. Odată stimulată, ea începe să se dividă, dublându-se numeric o dată la 4 zile. Dacă proliferarea ei ar scăpa de sub control, atunci, dintr-o singură celulă, în șapte luni de zile ar rezulta o populație de cca.  $5 \cdot 10^{15}$  celule, care ar depăși cu de peste 50 de ori numărul normal al limfocitelor aparținând tuturor clonelor existente în organism. În astfel de condiții viața ar fi imposibilă, deoarece ar fi suficient un singur stimul antigenic pentru ca să se declanșeze o proliferare celulară care ar "sufoca" în cele din urmă toate celelalte celule și țesuturi ale organismului. Uneori se întâlnesc asemenea situații, ca de pildă în cazul unor boli leucemice, când celulele se înmulțesc anarhic generând numeroși descendenți inoperanți din punct de vedere funcțional, sau în cazul unor proteine mielom, când în circulație există o mare cantitate de molecule nefuncționale. Din fericire, asemenea cazuri sunt rare, mecanismele de autocontrol și reglare menținând reacțiile imune în limite normale.

Principalii factori care intervin în reglarea răspunsului imun sunt: antigenul, anticorpul, complexele antigen-anticorp, citokinele, celulele sistemului limfoid, diferite elemente ale sistemului nervos și endocrin etc. (tabelul 100).



Efectori și mecanisme de reglare a răspunsului imun

Efectorii imunoreglării	Natură efectorilor	Mecanisme de acțiune
Antigenul	Diversă	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Doza, calea, secvența inoculărilor</li> <li>- Prezența sau absența unor epitopi</li> </ul>
Efectori celulari	Celulară	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elimină excesul de antigen (PMN etc.)</li> <li>- Macrofagele pot declanșa sau inhiba reacțiile imune</li> <li>- Existența unor populații celulare cu funcții diferite</li> <li>- Durata de viață a celulelor efectoare</li> <li>- Prezența obligatorie a tuturor populațiilor participante la reacție</li> <li>- Capacitatea de secreție a mediatorilor solubili</li> </ul>
Cooperările celulare	Diversă	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Necesitatea existenței a mai multe semnale pentru stimulare mărește posibilitatea de control și reglare a reacțiilor</li> </ul>
Mediatori umorali	De natură imuno-globulinică	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formează complexe cu antigenul</li> <li>- "Maschează" epitopii anulând reacțiile</li> <li>- Competiționează cu diverși mediatori umorali</li> <li>- Reglează răspunsul imun prin rețele idiotip-antiidiotip</li> </ul>
	De natură neimuno-globulinică	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activează sau inhibă proliferarea și funcțiile celulelor efectoare (PG, IL-2)</li> <li>- Enzime și hormoni care pot activa sau supresa răspunsul imun</li> </ul>

## ANTIGENUL CA ELEMENT DE REGLARE A RĂSPUNSULUI IMUN

Antigenul este primul reglator al reacțiilor de apărare, deoarece el poate declanșa aceste reacții, dar poate induce și o stare de toleranță, de supresie a lor. Modul de răspuns imun depinde de unele proprietăți fizice sau chimice ale lui, care pot fi supresoare sau stimulatorie, realizând așa-numita "calitate de adjuvant a antigenului".

Diferiți adjuvanți inoculați împreună cu același antigen favorizează diferite modalități de răspuns. De exemplu, când lipidele sunt cuplate cu antigene proteice, ele tind să se localizeze în zonele T-dependente și nu în cele B-dependente ale organelor limfoide secundare, și să inducă în principal reacții de hipersensibilitate de tip întârziat și mai slab reacții imune mediate umoral. Aceasta sugerează că proprietățile lipofilice direcționează antigenul spre diferite locuri unde există populații de celule APC programate să declanșeze diferite modalități de răspuns.



În linii mari, se poate afirma că potențialul reglator al antigenului depinde de forma sa fizică, de doză, de accesibilitatea sa la receptorii membranei celulare etc. În funcție de diverse condiții, aceeași moleculă poate induce o stare de inhibiție sau de stimulare, motiv pentru care unii autori au propus termenul de "amfigen" în loc de "antigen". De exemplu, polimerii solubili cu masa moleculară mai mică de 100 kD nu declanșează sinteza de anticorpi față de epitopii lor, dar sunt puternic inhibitori ai răspunsului imun față de formele imunogene ale aceluiași tip de molecule. Dacă însă molecula are o formă globulară, cu un număr de epitopi care să fie accesibili receptorilor celulari, atunci răspunsul imun umoral poate avea loc. Densitatea epitopilor pe moleculă, forma moleculei, rigiditatea și sarcina ei electrică, proprietățile ei hidrofobe sau hidrofile sunt tot atâția factori care pot influența și regula răspunsul.

Așadar, în reglarea indusă de către antigen, un rol important revine structurii lui moleculare. La nivelul lanțului polipeptidic ar exista o anumită secvență de aminoacizi care ar avea o afinitate particulară pentru antigenele MHC de clasa I sau II, declanșând fie activarea limfocitelor *Th*, fie a celor *Ts*. De exemplu, în cazul lizozimului neimunogen, eliminarea cu ajutorul unor aminopeptidaze a tripeptidului terminal Lys-Val-Phe poate duce la apariția unui derivat imunogen, adică la o moleculă care nu mai induce supresie ci activare. Deci, un singur determinant antigenic poate afecta imunogenitatea întregii molecule. Se pare că antigenul își poate exprima funcțiile sale imunoreglatoare și prin alte modalități: concomitent cu stimularea proliferării, ar stimula eliberarea unor factori supresori care pot inhiba activitatea unor celule neesențiale pentru răspunsul imun. În felul acesta, ar asigura un echilibru homeostatic activând sau frânând o expansiune clonală excesivă, având rol în prevenirea "toleranței de zonă joasă" - indusă de cantități mici de antigen, sau de "zonă înaltă" - generată de cantități mari de antigen. În pericol iminent de toleranță, s-ar realiza probabil un exces de celule de memorie care să asigure posibilitatea de proliferare a celulelor efectoare, realizându-se reacțiile imune pozitive chiar și în condițiile existenței unui prag scăzut de antigen. În cazul toleranței de zonă înaltă, s-ar realiza proliferarea excesivă a celulelor *Ts*.

Totuși, în unele condiții, stimulul antigenic nu generează reacții de apărare imună care să contribuie la eliminarea agresorului ci, dimpotrivă, creează o stare de acceptare, de tolerare a lui. Instalarea acestei stări este condiționată de doza de stimul care poate fi mică, fie datorită existenței unui număr redus de epitopi pe molecula de antigen, care nu pot asigura o intensitate stimulatorie corespunzătoare, necesară pentru antrenarea celulelor din faza de repaus  $G_0$  în celelalte faze ale multiplicării, fie datorită inoculării unui număr mic de molecule care, deși au densitatea epitopilor normală, totuși nu pot realiza stimulul. Administrarea pe cale orală sau inocularea i.v. a antigenului, fără adjuvanți, poate genera toleranță. Dozele mari de antigen induc toleranță prin antrenarea mecanismelor supresoare efectuate atât de către limfocitele *T* cât și de către cele *B*. Acest gen de toleranță este reversibil, după un anumit timp de la stimulul antigenic organismul recăpătându-și potențialul reacțional normal.

Succesiunea inoculărilor diferitelor antigene poate influența într-o manieră decisivă reacțiile gazdei. Se poate instala "competiția antigenică", în care primul antigen inoculat blochează posibilitatea de reacție a organismului față de antigenul inoculat ulterior. Ipoteză, supresia ar fi consecința activării, după stimularea organismului cu primul antigen, a unor celule supresoare, a eliberării unor factori supresori solubili sau a saturării - cu moleculele antigenului inoculat inițial - a macrofagelor, astfel că al doilea venit nu mai găsește suficiente celule APC disponibile. Acest gen de reglare are o mare importanță practică, deoarece condiționează eficiența sau ineficiența unor scheme de vaccinare.





Intensitatea răspunsului imun umoral este condiționată de existența unui echilibru dinamic între cantitatea de antigen, complexe antigen-anticorp și nivelul anticorpilor aflați în circulație. Rolul reglator al anticorpilor poate fi ușor pus în evidență experimental. De exemplu, se inoculează iepuri cu BSA (albumină serică bovină) și cu bacteriofagul  $T_2$ , care nu are înrudiri antigenice cu BSA. După două săptămâni, iepurii sunt supuși unei operații de plasmafereză pentru a li se îndepărta anticorpul anti-BSA aflați în circulație. Depleția acestora duce la o importantă creștere a sintezei lor fără nici un efect asupra nivelului anticorpilor anti- $T_2$  fapt care dovedește că anticorpul anti-BSA din ser inhiba sinteza altor molecule de imunoglobulină cu aceeași specificitate de recunoaștere.

În mod normal, la începutul stimulului, moleculele de antigen sunt recunoscute de către celulele care au receptori de mare afinitate care le fixează rapid, competiționând cu receptorii de mică afinitate de pe alte celule. Limfocitele *B* vor elibera deci în circulație molecule de anticorpi cu afinitate pentru antigen identică afinității receptorilor lor, deci anticorpi de mare afinitate. Ca atare, la începutul răspunsului imun umoral vor fi întotdeauna în circulație anticorpi de mare afinitate. Pe măsură ce receptorii de mare afinitate sunt "saturați", rămân determinanți antigenici disponibili și pentru celulele cu receptori de mai mică afinitate.

Anticorpul circulant competiționează cu receptorii pentru antigen de pe limfocite blocând epitopii și făcându-i inaccesibili receptorilor celulari (fig. 190). Cu cât afinitatea lor este mai mare, cu atât și efectul lor blocant este mai evident. O parte dintre anticorpul fixați pe molecula de antigen solubil aflată în circulație se vor fixa prin fragmentul *Fc* la receptorul pentru *Fc* de pe celulele fagocitare, favorizând fagocitoza opsonică și deci prelucrarea și prezentarea epitopilor de către celulele

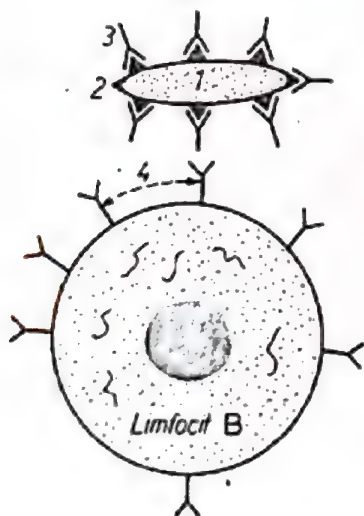


Fig.190. Modalități de blocare a recunoașterii antigenului de către receptorii pentru antigen de pe membrana limfocitului *B* în cazul competiției cu anticorpi liberi din circulație. Molecula de antigen (1) exprimă epitopii (2) care sunt recunoscuți specific și "mascați" de către anticorpi (3). În această situație, epitopul (2) nu mai are acces la receptorii pentru antigen (4) de pe suprafața limfocitului *B*.

APC. Dar, și unele molecule libere de anticorp se pot fixa prin *Fc* la receptorii *Fc* ai limfocitelor *B*, expunând spre exterior situsurile combinate care vor fixa și reține antigenul liber. În cazul în care o parte dintre epitopii de pe molecula de antigen sunt recunoscuți și de către receptorii pentru antigen de pe aceeași celulă atunci, condiționat de starea celulei, se transmit de la receptorii *Fc* semnale inhibitoare, care vor bloca răspunsul (fig. 191). În acest proces intervin relații doză-răspuns. În primele momente ale stimulului, antigenul este excedentar în comparație cu moleculele de anticorp, așa că stimularea celulei se va realiza în principal prin receptorii pentru antigen de pe membrană, inducând activarea ei. O parte din moleculele de antigen sunt recunoscute de către moleculele de anticorp, care se vor fixa citofil, inducând prin receptorii *Fc* semnale supresoare. Acestea sunt primite în special de către acele celule care au receptori cu o mai slabă afinitate pentru antigen, astfel că ele vor fi inițial supresate, pentru a permite celulelor cu receptori de mare afinitate să fie intens stimulate. Pe măsură ce moleculele de antigen rămân disponibile deoarece anticorpul, aflați încă la un nivel



redus, au fost "epuizați", încep să fie stimulate și celulele cu receptori de slabă afinitate, stimulare care are loc în condițiile existenței unui număr din ce în ce mai scăzut de molecule de anticorpi.

Ar părea paradoxală afirmația că reglarea și controlul răspunsului imun de către anticorpi se manifestă din primul moment al stimulării antigenice, deoarece există concepția, de altfel profund greșită, că anticorpii încep să fie secretați numai după stimul antigenic. Este însă bine cunoscut faptul că limfocitele B au receptori pentru antigen de natură imunoglobulinică care apar înaintea stimulării celulelor și care realizează de fapt recunoașterea specifică a antigenului. Acești receptori nu sunt altceva decât molecule de anticorp rămase atașate la membrana celulei, care se pot desprinde și ajunge în circulație sub formă de molecule libere. Este adevărat, numărul de molecule de imunoglobuline aflate în circulație înaintea penetrării antigenului este foarte mic, dar tocmai acest fapt contribuie la rolul lor reglator; inițial există un exces de antigen și sinteză de anticorpi din clasa IgM care favorizează semnalele pozitive, pentru ca mai târziu să se instaleze conversia spre moleculele de IgG care ajung în exces și care sunt sursa majoră de reglare negativă a semnalelor primite de către limfocitele B de la receptorul Fc. Izotipul anticorpilor are un rol hotărâtor; în general, anticorpii din clasa IgM stimulează răspunsul imun, iar cei aparținând clasei IgG îl inhibă. Moleculele de imunoglobulină aparținând clasei IgM stimulează răspunsul imun atât față de antigenele particulare cât și față de unele antigene solubile, cum ar fi ovalbumina (OVA) sau hemocianina (KLH). Stimularea este antigen-specifică, fiind condiționată de concentrația antigenului sau a anticorpilor și de secvența inoculărilor. Anticorpii inoculați înainte de antigen induc supresie pentru că, probabil, maschează epitopii (în cazul antigenelor celulare), iar cei inoculați după antigen stimulează răspunsul, stimulare care se pare că este dependentă de prezența complementului.

Complexul antigen + IgM ar activa complementul, care ar contribui la stimularea limfocitelor B legând încrucișat anticorpii fixați prin Fc la receptorii Fc, receptorii pentru antigen și receptorii pentru complement. Așa s-ar explica de ce persoanele cu deficit ereditar de complement au un răspuns imun mediat umoral, la stimuli cu antigene timo-dependente, mai slab decât persoanele normale.

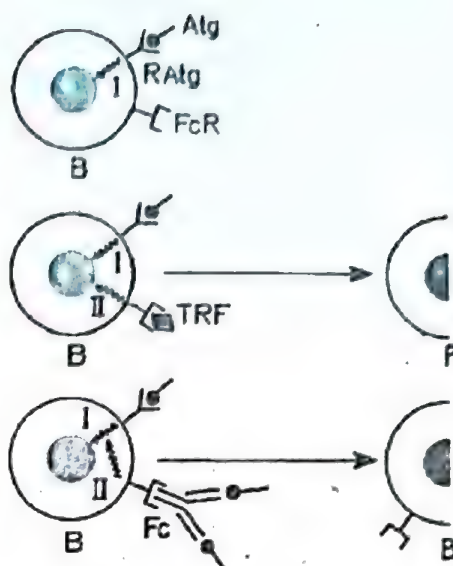


Fig.191. Mecanisme ipotetice de reglare a funcțiilor celulei B de către anticorpi sau alte citokine.

a. Pentru ca limfocitul B să fie activat, sunt necesare două semnale: unul de la antigen (semnal I) și altul de la receptorul Fc (semnal II). În cazul când este prezent numai semnalul I transmis prin receptorul pentru antigen (RAtg), celula nu este antrenată din faza de repaus Go.

b. În cazul în care se primește un semnal de la antigen prin RAtg (semnal I) și altul prin FcR de la o limfokină eliberată de către limfocitul T (TRF=factorul de înlocuire a celulei T), se realizează cele două semnale activatoare și celula evoluează spre plasmocit (p).

c. În exces de anticorpi, care vor forma complexe cu antigenul, FcR este ocupat de Fc al moleculei de imunoglobulină. Se va transmite un semnal inhibitor pentru semnalul I și limfocitul B nu va mai evolua spre celule formatoare de anticorpi, ci spre celula B de memorie.



Moleculele de IgG inhibă atât generarea celulelor efectoare, respectiv plasmocitele, cât și a celor de memorie. Există însă un prag de densitate a legării moleculelor de IgG sub care anticorpii nu mai pot induce supresia. De asemenea, este necesar ca receptorii pentru *Fc* ai celulelor să fie intacti, fapt care dovedește fără echivoc rolul acestora în instalarea supresiei de către anticorpi. De altfel, a fost dovedit faptul că *F(ab')* este de 1 000 de ori mai puțin supresor decât molecula intactă de IgG, iar aceasta, atunci când este neglicozilată, nu mai este supresoare pentru că nu se mai poate lega la receptorul *Fc*. Se pare că supresia prin IgG este rezultatul legării încrucișate a receptorului *FcγRII* cu receptori pentru antigen, cei pentru complement având un rol minor în acest proces, spre deosebire de activarea realizată de IgM, unde stimularea este rezultatul legării încrucișate a receptorilor pentru antigen cu cei pentru complement.

Reintroducerea antigenului în organism în situații de exces de anticorpi nu mai este urmată de stimularea răspunsului imun, fapt care și-a găsit unele aplicări practice. De exemplu, inocularea de anticorpi anti-*Rh* (seroterapie anti-D) previne bola hemolitică a nou-născutului. Practic, se previne imunizarea *Rh* a mamei de către eritrocitele fetei *Rh*<sup>+</sup> prin inocul pasiv de IgG anti-antigene D de *Rhesus*, imediat după naștere. Supresia indusă este antigen-specifică, anticorpii IgG fiind activi numai față de antigenul recunoscut specific de către situsurile combinate ale anticorpilor.

Există și situații în care anticorpii au efect protector nu pentru organismul gazdă, ci pentru structurile non-proprie, când "facilitează" proliferarea unor bacterii sau persistența grefelor de țesut normal sau neoplazic. Este cazul grefelor de organe sau de tumoră, care în prezența anticorpilor au o durată de rejecție mai prelungită sau o proliferare mai accelerată. Toate acestea sunt consecința "mascării" determinantilor antigenici de către anticorpi, mascare care pune în imposibilitate recunoașterea agresorilor de către celulele efectoare (vezi fig. 190).

### Reglarea prin anticorpi anti-idiotip

Este cunoscut faptul că un limfocit sintetizează un singur tip de moleculă de imunoglobulină, cu o anumită secvență a aminoacizilor în regiunea hipervariabilă a situsului combinativ (SC). Acest fapt face ca toate moleculele sintetizate de către o clonă de celule limfoide să recunoască un singur epitop și, ca atare, să-și exprime o structură complementară acestui epitop care va fi recunoscută de către celelalte celule ale organismului ca non-proprie. Partea internă a SC, care leagă epitopul, a fost denumită "paratop", iar specificitatea antigenică generată de paratop datorită formei sale particulare, "idiotip". Idiotipii sunt determinanții antigenici de la nivelul SC, unii fiind situați în interiorul paratopului, alții la exteriorul lui (fig. 192). Identificarea celor aflați în interiorul sau exteriorul paratopului se poate realiza prin inhibiția cu haptene. Dacă sunt în interior, haptenele inhibă

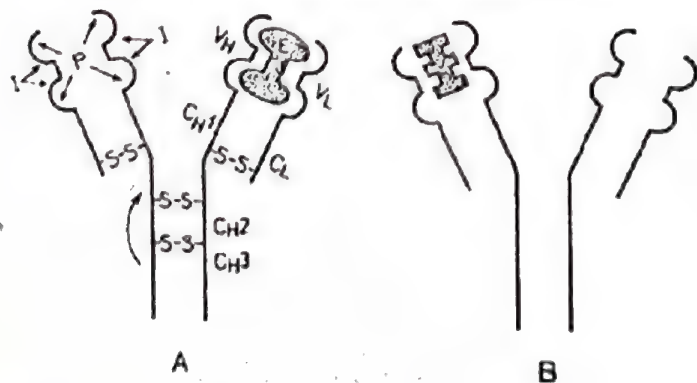


Fig.192. Anticorpii anti-idiotip, prin paratopul (P) de pe "fața internă" a situsului combinativ ( $V_H+V_L$ ), sunt complementari epitopului (E) pe care-l recunosc specific, luând forma exterioră (I), deci idiotopul, similară acestuia.

A. Anticorp anti-idiotip cu specificitate pentru epitop (E).

B. Anticorp anti-idiotip fără specificitate pentru epitop.



recunoașterea lor de către anticorpii anti-idiotip, deoarece sunt recunoscute și fixate de SC al moleculei de anticorp. Dacă sunt situate la exterior, pretratarea anticorpilor cu haptena specifică nu inhibă recunoașterea lor de către anticorpii anti-idiotip.

Întreaga teorie este cunoscută sub denumirea de "teoria rețelei", deoarece sistemul imun apare ca o rețea de molecule de imunoglobulină, care recunosc specific alte molecule de imunoglobulină. În această "rețea" paratopul va recunoaște specific epitopul imunogenului, devenind la rândul său determinant antigenic, adică idiotip care va stimula sinteza altor molecule de imunoglobulină cu paratopi specifici idiotipului nou-format. Conform acestei teorii, un antigen induce sinteza de anticorpi  $A_1$  cu o secvență a aminoacizilor unică la nivelul situsului combinativ ( $I_1$  adică idiotip $_1$ ). Dar acest  $I_1$  este imunogen pentru organism. El stimulează sinteza anticorpilor  $A_2$  cu  $I_2$  care au specificitate anti- $I_1$ , dar stimulează sinteza anticorpilor  $A_3$  care vor exprima  $I_3$ . Deci organismul, care sintetizează molecule de imunoglobulină cu funcție de anticorp față de un anumit antigen, recunoaște aceste molecule ca străine și produce alte molecule care le neutralizează. Ca atare, o moleculă de anticorp este recunoscută drept antigen de către limfocitele altei clone care o vor considera "străină" și vor sintetiza anticorpi față de ea. Se formează o adevărată "rețea" în care, pe lângă limfocitele  $B$ , sunt implicate și limfocitele  $T$ , deoarece exprimă receptori pentru antigen cu situs combinativ identic celor existenți pe receptorii de natură imunoglobulinică de pe limfocitele  $B$ . Toate aceste elemente interacționează și se mențin într-o stare de perfect echilibru. În momentul în care intervine antigenul, acest echilibru este dereglat, se declanșează răspunsul imun și sinteza de anticorpi de "generația  $A_1$ ". Acești anticorpi, datorită idiotipului lor particular, de formă complementară epitopului, vor stimula producerea de  $A_2$ , a căror conformație este identică epitopului. În acest fel, molecula de anticorp, generată ca răspuns specific la un antigen, neutralizează antigenul și generează prin însăși structura ei un nou stimul antigenic. Așadar anticorpii  $A_2$  sunt ei înșiși determinanți antigenici sau, cum se mai numesc, determinanți anti-idiotip, față de care organismul poate produce anticorpi anti-anti-idiotip sau  $A_3$  care vor fi similari structural cu  $A_1$ , astfel că ciclul se închide, în sensul că anticorpii  $A_1$  recunosc epitopul și-l neutralizează,  $A_2$  neutralizează la rândul său pe  $A_1$ , fiind similari conformațional cu epitopul, iar  $A_3$ , similari cu  $A_1$ , neutralizează pe  $A_2$  care pot realiza, datorită asemănărilor lor cu antigenul, stimulul antigenic specific. Așadar, moleculele de imunoglobulină prin anticorpii anti-idiotip  $A_2$  pot mima morfologia oricărei molecule străine care pătrunde în organism și se manifestă ca un antigen.

Anticorpii anti-idiotip au rol reglator. Inoculați în doze mari, blochează sinteza anticorpilor. În doze mici, stimulează răspunsul imun pentru că participă alături de epitopi, cu care se aseamănă perfect, la stimularea antigenică, evitând printre altele instalarea toleranței de zonă joasă, atât la nivelul limfocitelor  $B$  cât și la nivelul limfocitelor  $T$ . Se transmit de la mamă la fetus.

Teoria rețelei este confirmată de către o serie de date experimentale. Astfel, s-a demonstrat că determinanții idiotipici pot induce sinteza anticorpilor anti-idiotip chiar și atunci când imunizările se fac în sistem singenic sau autolog, ceea ce denotă că limfocitele recunosc idiotipia imunoglobulinelor izologe sau autologe. Mai mult decât atât, recent s-a demonstrat că anticorpii  $A_2$ , identici ca formă epitopului, pot fi folosiți ca imunogene, respectiv ca vaccinuri. Până în prezent s-au încercat astfel de vaccinuri în rabie, hepatită epidemică etc. Ele sunt lipsite de inconveniente pe care le au vaccinurile naturale deoarece, în loc de agenții infecțioși respectivi, stimulul este dat de către anticorpii anti-idiotip  $A_2$ . De



asemenea, recent a fost demonstrată existența clonelor de limfocite *T* care recunosc determinanții idiotipici intrinseci, fapt care confirmă valabilitatea acestei teorii nu numai în cazul imunității umorale, dar și în cazul celei celulare.

În general, reglarea idiotipică este importantă la organismele tinere, în perioada imediat post-natală, când are loc stimularea clonelor virgine. Ulterior, intervin alte mecanisme de reglare, mult mai operante.

### Reglarea prin complexe antigen-anticorp

Recunoaște practic aceleași mecanisme funcționale ca și anticorpul circulant, complexe putând activa răspunsul imun prin facilitarea fagocitozei opsonice și activarea prezentării antigenului de către celulele APC. Pot însă inhiba răspunsul imun prin legarea încrucișată a receptorilor pentru antigen cu receptorii pentru *Fc* de la nivelul limfocitelor *B*.

Capacitatea imunoreglatoare a complexelor imune asigură sistemul imun cu un mijloc de control potent. Factorii reumatoizi (Ig anti-*Fc* a Ig) și anticorpul anti-idiotip (Ig anti-*Fab* a Ig) sunt exemple de liganzi cu capacitate potențială de interferare a reacțiilor imune cu efecte reglatoare negative sau pozitive. În exces de complexe antigen-anticorp se instalează deviații grave ale răspunsului imun care depășesc limitele fiziologice normale (vezi "Hipersensibilitatea imediată de tip III").

### REGLAREA PRIN CITOKINE

Citokinele sunt principalii factori de reglare a reacțiilor imune care intervin în mod hotărâtor atât în activarea cât și în supresia sau orientarea acestora. Deoarece ele acționează în interdependență unele cu altele, formează o adevărată rețea de mesaje biochimice care controlează atât proliferarea celulelor cât și funcțiile lor.

De exemplu, prezența antigenelor activează macrofagele care nu numai că le vor prelucra și prezenta sub restricție MHC limfocitelor *T* sau *B*, dar se vor elibera și diverse monokine, ca de pildă IL-1 care vor acționa ca niște co-semnale pentru limfocite. Limfocitele *T* stimulate de către antigen sintetizează IL-2 care va activa exprimarea propriului receptor. Pe lângă IL-1, macrofagele activate transmit semnale spre *T* prin IL-6, PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> etc., sau spre *B*, unele dintre ele fiind activatoare iar altele inhibitoare. O parte din citokine, ca de pildă TGF- $\beta$  sintetizat de diferite celule și în special de către macrofage, sau IFN- $\gamma$  sintetizat de limfocitele *T* activate, au efecte inhibitoare; altă parte, ca IL-2, au efecte activatoare asupra proliferării limfocitelor. Unele acționează antagonist iar altele sinergic. Astfel, TGF- $\beta$  inhibă sinteza IL-2 și IL-6, interferonul- $\gamma$  inhibă sinteza IL-4, în timp ce IL-4 și IL-6 sunt inductori ai sintezei IL-1. Interleukina-5 acționează sinergic cu IL-4 în sinteza IgG1 și cu IL-1 și IL-2 în sinteza IgM, IL-6 acționează sinergic cu IL-1, IL-2, IL-3 etc. Efectul lor depinde și de pragul concentrației în ser sau țesuturi. De pildă, numeroase citokine cunoscute pentru proprietățile lor de activare a unor funcții imune, ca IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 etc., atunci când sunt sintetizate în cantități mai mari decât normal, sunt capabile de a-și inhiba fie propria lor sinteză, fie exprimarea propriului receptor, realizând un proces de autoreglare și autocontrol care frânează răspunsul imun fie direct, fie prin activarea unor hormoni imunodepresori de genul progesteronului sau glucocorticoizilor. Prostaglandinele, derivate din degradarea fosfolipidelor membranei celulare prin calea ciclooxygenazică, activează cAMP prin intermediul căruia reglează răspunsul imun. Ele inhibă



eliberarea IL-1, această limfokină "pivotală" a cooperărilor celulare, TNF- $\alpha$  care reglează citotoxicitatea, IL-2 cu rol în expansiunea clonală a limfocitelor T etc. Reglarea negativă exercită și alte molecule cu rol în procesele inflamatorii ca LTB<sub>4</sub>, histamina, serotonina etc.

Mecanismele lor de acțiune sunt complexe și încă insuficient cunoscute. Se pare că intervin la diverse nivele ale transmiterii semnalelor de la receptori de suprafață către un nucleu, activând sau întrerupând lanțul biochimic informațional. De exemplu, IL-4 produsă de către limfocitul Th activat poate anula efectul inhibitor al semnalelor primite de la receptorul Fc de către limfocitele B ca urmare a legării încrucișate a acestuia cu receptorul pentru antigen. Întreruperea acestui mesaj permite activarea limfocitului B chiar în condițiile în care există deja în circulație un anumit prag al complexelor antigen-anticorp, care ar fi inhibitoare pentru evoluția celulelor B spre plasmocit. Această evoluție este întreruptă de-abia atunci când limfocitul T revine la faza G<sub>0</sub> și nu mai secretă limfokine. Desigur, celulele efectoare ale imunității sunt influențate de către o populație numeroasă de molecule de citokine care acționează nu numai asupra celulelor din seria limfoidă sau mieloidă ci și asupra altor populații cu rol nespecific în apărarea imună. De pildă, IL-3 induce eliberarea histaminei de către bazofile, acționând probabil via IgE (îndepărtarea IgE de pe suprafața celulelor anulează efectul activator al IL-3), dar nu printr-o acțiune directă, ci prin intermediul altor molecule secretate de către bazofile sub influența acestei limfokine. TNF- $\alpha$  activează procesele oxidativ-respiratorii și secreția moleculelor active de oxigen, ca urmare a reducerii pragului cAMP la granulocitele PMN, reducere urmată de reorganizarea filamentelor de actină și activarea capacității de atașare la suprafețe a acestor celule.

Toate acestea subliniază importanța profundă a activităților biologice exercitate de către citokine în general și interleukine în special. Ele acționează complex, asupra tuturor compartimentelor de apărare imună.

În fond, organizarea sistemului imun poate fi comparată cu cea a creierului. Omul are un creier "arhaic", telencefalul, care a funcționat și funcționează la viețuitoarele rămase pe trepte inferioare de dezvoltare, asigurând realizarea proceselor vitale esențiale: înervarea motorie și senzitivă a organelor esențiale și recepționarea informațiilor din mediul extern. Peste el s-a "suprapus" o formație cerebrală evoluată, emisferile cerebrale ale encefalului care asigură procesele complexe biologice, inclusiv activitatea rațională, capacitatea de înmagazinare (memorie) etc. În fond, și sistemul imun este format din două "compartimente": unul "arhaic", capabil să recunoască și să distrugă nespecific agresorul străin de organism, compartiment alcătuit din celule fagocitare și celule implicate în procesele inflamatorii (granulocite PMN, eozinofile, bazofile, mastocite) și altul "evoluat", aparținând seriei limfoide, care are inventariate toate posibilitățile de exprimare antigenică existente în natură. Acest sistem "evoluat" este format din populații (clone) de celule capabile să recunoască specific agresorul și să păstreze memoria contactului cu el. Existența acestor două compartimente diferite se poate uneori observa în clinică: la pacienții cu imunodepresii grave dobândite sau congenitale, există o activare impresionantă a funcțiilor PMN asociată cu o scădere sau absență totală a funcțiilor limfocitelor T sau B.

Citokinele controlează și reglează funcțiile tuturor efectorilor nespecfici și specifi ai apărării, contribuind poate în cel mai înalt grad la menținerea funcțiilor acestora în limite normale.



## Reglarea prin alte molecule

Majoritatea hormonilor pot modula activitatea granulocitelor și în special a limfocitelor. Astfel, estrogenii pot mări producția de anticorpi anti-ADN, hormonii de creștere stimulează proliferarea celulară, encefalinele contribuie la controlul răspunsului imun de către sistemul nervos, iar hormonii tiroidieni, progesteronii și în special glicocorticoizii sunt puternic inhibitori ai răspunsului imun. Efect reglator au și moleculele de alfa-globuline, ca de pildă alfa-fetoproteine, alfa1-antitripsina, fetuina, care deprimă reacțiile imune mediate umoral și celular, contribuind la blocarea fiziologică a rejecției grefei fetale de către organismul matern. Proteina C reactivă, proteina S de "fază lungă" alfa2-macroglobulina și alte proteine care apar în procesele inflamatorii sau neinflamatorii sunt participante la reglarea imunității.

### MECANISME REGLATORII DATORATE COOPERĂRILOR CELULARE

Diferitele modalități de cooperare celulară pot avea rol reglator prin însăși existența lor. De exemplu un limfocit, pentru a se divide, are nevoie de cel puțin două semnale; unul de la antigen și altul de la o celulă ajutătoare. Prin acest sistem, reacția celulei poate fi abolită sau amplificată atât de către factori care intervin asupra antigenului care emite semnalul I, cât și de către cei care intervin asupra celulelor ajutătoare sau mediatorilor solubili generatori ai semnalului II. În acest fel, cooperările celulare amplifică mijloacele de control și reglare, dublând posibilitatea de intervenție a factorilor reglatori. Spre deosebire de celulele cu dublă funcționalitate – efectoare și reglatoare – cum este cazul macrofagelor sau limfocitelor *B*, există celule care exercită exclusiv funcții efectoare. Existența acestora este ușor de demonstrat *in vivo*: dacă șoarecii iradiați letal sunt reconstituiți cu celule provenite din splina șoarecilor normali, vor răspunde normal la stimulii antigenici, dar dacă sunt reconstituiți cu celule provenite din splina animalelor tolerante pentru antigenul respectiv, nu vor răspunde pentru că au primit celule *T<sub>s</sub>*. Există un sistem direct de comunicare intercelulară, prin "punți de antigen" și un sistem indirect, prin molecule eliberate de limfocitele *T*, macrofage etc.

Se știe că limfocitul *Th* poate fi activat numai în condițiile în care informația despre antigen, respectiv semnalul I, este transmisă de către o celulă accesorie care exprimă moleculele MHC de clasa II, ca de pildă antigenele DR la om, identice cu cele ale celulei *Th*. În caz de incompatibilitate MHC, semnalul II costimulator nu poate fi transmis și cooperarea nu mai poate avea loc. Dar populația de celule este eterogenă din punct de vedere al moleculelor de clasa II a MHC, din cauză că la nivelul macrofagelor operează două direcții de circulație a informațiilor: o direcție merge de la macrofage către limfocitele *Th*, iar altă direcție, de la *Th* către macrofage. Inițial, celula accesorie antrenează un circuit amplificator, pentru ca ulterior să sufere influența inhibitorie a acestui circuit, care va aduce o tranziție de la un fenotip  $DR^+$  la altul  $DR^-$ . Această tranziție dinamică nu definește o populație sau populații stabile de macrofage, ci mai degrabă stadii diferite de dezvoltare, ca expresii ale unor relații de reglare și control pe care le induce, dar care se răsfrâng asupra lor, jocul  $DR^+/DR^-$  fiind responsabil de deosebirile existente în ce privește potențialul de prezentare a antigenului. O celulă  $DR^+$ , chiar dacă a fagocitat antigenul, nu poate coopera decât cu acea celulă *Th* căreia îi poate



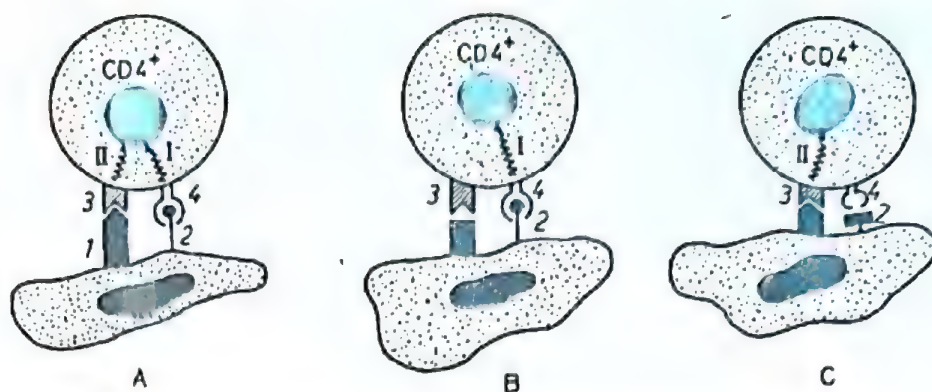


Fig. 193. Modalități posibile de reglare a răspunsului imun prin cooperări celulare.

A. Limfocitul Th ( $CD4^+$ ) este activat numai în condiția în care primește două semnale; semnalul I de la antigen (2) prin receptorul pentru antigen (4), și semnalul II de la MHC (1) al celei APC prin laturile  $\alpha\beta$  ale CD4 (3). Lipsa MHC de pe celula APC corespunzătoare speciei (B) sau prezentarea unui antigen care nu corespunde receptorilor de pe membrana celei T (C) nu este urmată de activarea acesteia, deoarece, nu se poate asigura semnalul II, respectiv I.

transmite semnalul II (fig. 193). În afară de relațiile care se stabilesc între celulele participante la răspunsul imun și care influențează exprimarea DR, mai pot interveni și alți factori. De exemplu unii agenți derivați din microorganisme, cum ar fi zimozanul din *Sacharomyces cerevisiae* sau endotoxinele colibacililor, reduc numărul macrofagelor  $DR^+$  și, implicit, dezvoltarea reacțiilor imune.

Intervenția limfocitelor *T* inductoare, ajutătoare, amplificatoare, supresoare sau contrasupresoare a devenit evidentă în cursul cercetărilor care urmăreau efectul transferului de celule recoltate de la animale normale asupra celor tolerante sau iradiate letal. Cu această ocazie s-au putut stabili următoarele:

1. Răspunsul imun față de antigenele timo-independente crește după tratamentul animalelor stimulate cu ser antilinfocitar. Deci, serul distruge limfocitele *Ts* și favorizează funcțiile limfocitelor *B*.

2. Se poate induce supresia alotipică la animale normale dacă li se inoculează limfocite *T* provenite de la animale care au supresie alotipică cronică. *In vitro*, celulele animalelor normale sunt inhibitate în răspunsul lor dacă sunt cultivate împreună cu limfocitele *T* ale animalelor supresate. Deci, animalele supresate au în exces limfocite *Ts*.

3. Limfocitele *T* stimulate *in vitro* cu ConA suprimă răspunsul imun al celulelor normale, deoarece ConA activează proliferarea *Ts*.

4. Animalele "nereactive" genetic au predominant limfocite cu funcții supresoare (*Ts*).

Inițial, semnalele transmise de către antigen activează funcțiile efectorii ale limfocitelor. Urmează un complex de reacții care, fie că măresc, fie că suprimă răspunsul imun și care sunt sub controlul unor circuite imunoreglatorii complexe. Se pare că declanșarea funcțională de către antigen a celei *Th* este însoțită în mod automat și de emiterea de semnale de către celule cu funcții supresoare sau contrasupresoare. Interacțiunea dintre *Ts* și ținta sa este sub control genetic, exact cum sunt interacțiunile acestei ținte cu celulele *Tc*. Cu alte cuvinte, celulele *Ts* care deprimă funcția unei singure clone de limfocite, cu receptori de membrană pentru un anumit epitop, exprimă aceleași antigene MHC de clasa I sau II și aceleași specificități idiotipice ca și limfocitele *Th* a căror generare sau funcție o inhibă. În afară de limfocitele *Ts* cu specificitate pentru o singură clonă de celule *Th*, ar exista și limfocite *Ts* nespecifice, care pot inhiba mai multe clone de celule



*T*. Proliferarea acestor limfocite *T*s nespecifice ar fi consecința unor activări policlonale induse de activatori de genul ConA. La rândul lor, sunt sub controlul celor *T*c, interacțiunea dintre aceste două subtipuri celulare ducând la inactivarea funcțională a celor *T*s.

Trebuie totuși subliniat faptul că existența celulelor supresoare, specifice sau nespecifice, este încă discutabilă la om, iar proliferarea de clone *T*s este problematică. Este posibil ca limfocitele *T*s să se supună acelorași reguli de recunoaștere, cooperare și control ca și celulele ajutătoare sau efectoare ale imunității, fapt care ridică problema dacă nu cumva ele nu există decât ca forme funcționale aflate într-o anumită etapă evolutivă sau condiționate de o situație existentă la un moment dat în relația organism-agresor: în faza de debut a răspunsului imun aceeași celulă acționează ca și celulă amplificatoare sau chiar efectoare, pentru ca, la sfârșitul lui, să devină supresoare. În fond ar fi o acțiune similară unui sistem termostatat în care aceeași piesă, condiționată de nivelul temperaturii existent la un moment dat, deschide sau închide circuitul electric, comportându-se deci ca "activator" sau "supresor" al procesului fizic respectiv. Bineînțeles, există posibilitatea funcționării a două piese diferite: una care să activeze "încălzirea" și alta care s-o "blocheze". Aceeași situație ar putea fi și în organism, în sensul că ar putea exista limfocite *Th* și *T*s ca populații distincte nu numai sub raport funcțional.

Există și o altă posibilitate: supresia să fie consecința activării unor celule citotoxice autoreactive care, la un moment dat, să "ucidă" celulele efectoare care "și-au făcut datoria", inhibând astfel reacțiile imune prin "deleție" celulară. Acest concept ar explica oarecum de ce atât limfocitele *T*c cât și cele *T*s sunt CD8<sup>+</sup> (deși limfocitele *T*s au receptorul E termorezistent), în sensul că și unele și altele nu sunt altceva decât celule *T*c care "văd" ținte străine sau "ținte proprii" respectiv limfocitele efectoare *T* sau *B*. Existența de clone de limfocite *T* citotoxice autoreactive a fost demonstrată experimental, fapt care validează ipoteza că nu există celule *T*s ci funcții supresoare exercitate de populații citotoxice care ucid efectoarele, deci un fel de supresie indusă prin eliminarea celulelor active. Procesul este similar celui descris la rețeaua idiotipică: limfocitele *T* care răspund sistemului și ucid ținta ar fi similare anticorpilor A<sub>1</sub>, iar *T*s (sau citotoxice pentru A<sub>1</sub>) ar corespunde celor A<sub>2</sub>, care ar recunoaște prin receptorul pentru antigen complexul idiotip-MHC de pe A<sub>1</sub>, fiind în fond celule *T* autoreactive anti-idiotip.

În afară de limfocitele *T*, un rol important în reglarea răspunsului imun revine și macrofagelor. Acestea, după cum s-a menționat anterior, prelucrează și dozează antigenul concentrându-l sau reținându-l pentru a menține intensitatea stimulului la nivel constant, eliberează monokine cu rol de semnale auxiliare activatoare cum este cazul IL-1, sau inhibitoare (PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>) și cooperează prin contact direct cu alte limfocite. *In vitro* s-a constatat că limfocitele *T* nu pot răspunde la antigene sau mitogene decât în prezența macrofagelor, activarea limfocitelor *T* de către antigen depinzând de raportul limfocit *T* /macrofag: când raportul este mai mare de 5, are loc activarea celulelor *T*, iar când acest raport este în jurul valorii de 1, nu mai are loc activarea, fapt care sugerează și existența unor funcții supresoare ale macrofagelor (când sunt multe inhibă activarea celulelor *T*), probabil datorate secreției în cantități mari de PGE<sub>2</sub> și alte monokine.

#### REGLAREA NEUROENDOCRINĂ

Sistemul imun are numeroase conexiuni cu sistemul neuroendocrin, fiind în mare măsură influențat de către acesta, în special prin intermediul timusului care primește semnale atât de la hipotalamus cât și de la glanda pituitară anterioară. De altfel, atât organele limfoide primare cât și cele secundare au numeroase filete

nervoase, nor-adrenergice, adrenergice sau colinergice, dintre care unele sunt în contact direct cu limfocitele *T*.

Limfocitele au receptori pentru numeroși hormoni (tabelul 101), fiecare hormon influențând mai mult sau mai puțin caracteristic răspunsul imun (tabelul 102).

În cazuri de stres, sau în cursul unor administrări terapeutice deliberate, creșterea nivelului corticosteroizilor de exemplu, sau a endorfinelor ori met-enkefalinei induce o depresie reversibilă a răspunsului imun. Aceste efecte supresoare sunt contracarate de către hormonul pineal și de către melatonină.

În afară de catecolamine și corticosteroizi secretați de către corticosuprarenale, precum și de hormonii de creștere secretați de pituitara anterioară, țesutul limfoid mai poate fi influențat de hormoni de sex, de tiroxină sau de semnale nervoase venite de la hipotalamus. La rândul lor, celulele limfoide influențează hipotalamusul, pituitara anterioară și alte compartimente neuroendocrine prin interleukine și în special prin IL-1, ACTH, prin factori supresori ai histaminei (HSF) produși de către limfocitele *T* etc. Unele dintre acestea, ca de pildă IL-1 sau interferonii, au efecte analgezice asupra sistemului nervos, fiind considerate ca "neuropeptide morfinice".

Tabelul 101

**Receptori pentru neuromediatorii și neurohormoni la nivelul celulelor sistemului imun**

Celula	Receptori pentru
<i>T</i>	Somatostatină Peptida vasointestinală (VIP) Substanța P (SP) Leu-enkefalina Met-enkefalina $\beta$ -endorfină Corticotropina
<i>B</i>	Substanța P (SP) Peptida vasointestinală (VIP) Corticotropina
Monocite	Substanța P (SP) Enkefaline Endorfine
Granulocite	Substanța P (SP) Somatostatina Endorfine
Celule NK	$\gamma$ -endorfine $\beta$ -endorfine Metencefaline



Efectele unor neuromediatorii și neuropeptide asupra celulelor sistemului imun

Neuromediatorul	Efectul
Noradrenalina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibă proliferarea limfocitelor</li> <li>- Reduce activitatea limfocitelor Tc</li> <li>- Activează sinteza anticorpilor</li> </ul>
Beta-endorfine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activează proliferarea limfocitelor</li> <li>- Activează activitatea NK</li> <li>- Suprimă sinteza anticorpilor</li> <li>- Activează producerea de IFN-<math>\gamma</math></li> <li>- Inhibă migrarea leucocitelor</li> </ul>
-Substanța P	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activează proliferarea limfocitelor T</li> <li>- Stimulează activitatea fagocitară a granulocitelor și macrofagelor</li> <li>- Induce degranularea mastocitelor</li> <li>- Mărește chemotactismul leucocitelor</li> </ul>
VP (Pepsina vaso-intestinală)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibă proliferarea limfocitelor T</li> <li>- Inhibă migrarea leucocitelor</li> <li>- Inhibă producerea de IL-2</li> <li>- Inhibă activitatea NK</li> </ul>

## ALTE MECANISME DE REGLARE

Durata de viață a celulelor efectoare sau deleția unor populații celulare reprezintă mijloace eficiente de reglare, uneori reversibile, alteori ireversibile. De exemplu, durata de viață relativ scurtă a celulelor efectoare face ca acestea să-și înceteze activitatea, întregul proces reactiv stingându-se relativ repede după eliminarea antigenului. De asemenea, absența unor clone celulare, moștenită congenital sau indusă accidental, modifică profund potențialul reactiv imun. Este cunoscut cazul unor tulpini consangvine de cobai care nu pot răspunde la stimuli cu anumite antigene din cauză că nu au clonele de limfocite Th, care activează clonele de celule B cu receptori pentru antigenul respectiv.

Controlul răspunsului imun este un proces biologic obligatoriu și complex care interesează nu numai efectoarele imunității, ci și alte sisteme și organe, începând cu centrul termoreglator și terminând cu sistemul neuroendocrin. De fapt, nu se poate face o distincție netă între mecanismele care stau la baza generării și desfășurării reacțiilor imune și cele care reglează și controlează aceste reacții, deoarece ele sunt simultane și se condiționează reciproc. Aceasta este încă o dovadă a unității funcționale și structurale a organismului care în mod cert este un tot unitar indivizibil.

## EVOLUȚIA SISTEMULUI IMUN ȘI A FUNCȚIILOR SALE

Sistemul imun al mamiferelor este rezultatul unor îndelungate procese selective și de adaptare ale organismului, care au avut și au loc atât la nivel de specie cât și la nivelul fiecărui individ. De-a lungul procesului evolutiv, presorii selectivi din mediu au eliminat organismele slab dezvoltate sau inadaptabile, supraviețuind numai cele care au fost capabile să anuleze influențele negative.

Deci, în cursul evoluției filogenetice, au supraviețuit numai acei subiecți care s-au adaptat la condițiile de mediu și care au generat noi specii, înzestrate cu funcții și organe mult mai eficiente. Dintre aceste funcții și organe, un loc important revine sistemului imun. Dacă evoluția filogenetică se referă la îndelungatul proces de formare a speciei, cea ontogenică definește secvența evenimentelor care controlează formarea individului din momentul concepției până la maturarea lui fiziologică. Ca și specia, individul este mai mult sau mai puțin expus acțiunii modificatoare a factorilor de mediu cu care trebuie să găsească un *modus vivendi* convenabil. În cazul unei inadapări el va dispărea, supraviețuind numai acei subiecți care s-au acomodat rapid și care vor continua procesul evolutiv și perpetuarea speciei.

Cunoașterea gradului de dezvoltare a sistemului și funcțiilor imune, la nivelul diferitelor etape ale evoluției filogenetice sau ontogenetice, are o importanță teoretică și practică majoră deoarece, pe de o parte, ajută la o mai bună înțelegere a proceselor și mecanismelor de apărare imună, iar pe de altă parte, contribuie la optimizarea posibilităților de controlare a lor.

## FILOGENIA IMUNOCOMPETENȚEI

Imunitatea "nespecifică" a vertebratelor poate fi bine înțeleasă numai prin cunoașterea corectă a apărării nevertebratelor, indiferent dacă acestea sunt organisme formate dintr-o singură celulă sau dintr-o colonie de celule, fără cavitate corporală ("acoelomate") sau cu cavități corporale ("coelomate"), din care au derivat artropodele și vertebratele, cu enorma lor diversitate de specii.

Trebuie menționat faptul că studiul imunității la nevertebrate, deși își are începuturile încă din secolul XIX, este încă puțin dezvoltat. Cu toate că începuturile cunoștințelor noastre privitoare la apărarea prin fagocitoză își au originea în studiile făcute de către MECINICOFF pe nevertebrate, totuși, aprofundarea lor la nevertebrate nu a înregistrat progrese remarcabile. Încă nu se cunosc multe din mecanismele care stau la baza apărării celenteratelor, acoelomatelor, moluștelor



sau artropodelor. Se știe doar că această apărare există, că este extrem de eficientă, dar nu se știe în amănunt care sunt efectorii ei moleculari și cum acționează acești efectori.

Este considerat imunocompetent organismul care are capacitatea de a deosebi structurile proprii de cele străine, deci care este capabil să recunoască și să reacționeze specific la diferite antigene. Acest răspuns implică sinteza de imunoglobuline, rejecția homogrefelor, proliferarea clonelor de celule imunocompetente după contactul cu antigenul, dezvoltarea reacțiilor de hipersensibilitate și instalarea memoriei imunologice, exprimată prin sinteză activă de anticorpi după stimulul antigenic secundar, sau prin rejecția accelerată a greșei secunde. Toate acestea sunt atribute funcționale ale organismelor superioare, respectiv ale vertebratelor superioare (păsări, mamifere) dotate cu un sistem specializat de apărare. Dar, pe plan evolutiv, păsările și în special mamiferele ocupă treptele de sus ale scărilor evolutive.

Cercetările din ultimele 2 - 3 decenii privind aspectele evolutive ale imunologiei pledează tot mai mult în favoarea existenței unor mecanisme de apărare, la nevertebrate pe de o parte, și a unui sistem imun cu caractere comune tuturor vertebratelor pe de altă parte, în sensul că toate acestea posedă limfocite, sintetizează imunoglobuline și rejectează alogrefele (tabelul 103). Dezvoltarea pe scară filogenetică a țesutului limfoid este asociată cu capacitatea de a reacționa mai rapid și specific la un spectru tot mai larg de antigene, iar studiile asupra structurii imunoglobulinelor prezente la speciile aflate pe diferite trepte de evoluție sunt de un real interes pentru înțelegerea multor mecanisme care guvernează sinteza acestui tip de proteine.

Tabelul 103

## Dezvoltarea sistemului imun în cursul evoluției filogenetice

Trepte de evoluție		Organe, celule sau funcții imune prezente
Clasă	Ordin	
Nevertebrate		Rudimente de celule fagocitare Reacții primitive de tip anafilactic Aglutinine primitive (?)
Cyclostomata	<i>Myxinoidea</i> (peștii viermiformi)	Prezența unui rudiment de splină eritropoietică Celule asemănătoare limfocitelor
	<i>Petromyzontia</i> (pești primitivi, șipar)	Timus primitiv Splină limfopoietică Limfocite prezente în circulație Răspuns imun adaptativ rudimentar: - rejecție de țesuturi - sinteză de anticorpi - memorie imunologică

Trepte de evoluție		Organe, celule sau funcții imune prezente
Clasă	Ordin	
Elasmobranchii	Selacieni (rechinii)	Timus dezvoltat (zonă medulară și corticală) Splină cu focare limfoide Focare limfoide la nivelul gonadelor și intestinului Limfocite circulante, lipsa plasmocitelor IgM primitiv
	Batoidea (rechinii plăți)	Timus dezvoltat, involuează cu vârsta Splină bine organizată (pulpă albă și roșie) Țesut limfoid abundent Apar plasmocitele
Actinopterygii	Sturionii cartilaginoși	Timus definitiv organizat (cu lobi, lobuli) Splina bine organizată (pulpă albă, roșie) Existența limfocitelor în toate stadiile de dezvoltare, inclusiv plasmocite Țesut hematopoietic pericardic, similar măduvei osoase Sinteza a două clase de imunoglobuline cu constanta de sedimentare 7S și 19S Răspuns primar și secundar viguros
Tetrapoda	Amfibii	Apar nodulii limfatici primitivi, cu foliculi limfoizi încapsulați
	Reptile	Amigdale primitive Celule plasmactice în "lamina propria" a intestinului (apărare locală, precursori IgA)
Aves (păsări)		Existența mecanismului de apărare imună dublu: umoral și celular Prezența limfocitelor T și B Clase bine precizate de imunoglobuline IgM și IgG, cu subclase IgG Absența anticorpilor IgA și IgE
Mammalia (mamifere)		Sistemul imun și funcțiile imune sunt complet și complex dezvoltate

#### IMUNITATEA LA NEVERTEBRATE

Nevertebratele sunt forme primitive de viață care au evoluat din organismele unițelulare pe două mari direcții principale: o direcție care are ca punct culminant apariția insectelor și moluștelor, și alta din care s-au desprins vertebratele, care pe plan evolutiv au culminat cu mamiferele (fig. 194).

În afară de vertebre, nevertebratelor le lipsesc și organele limfoide cu forma de organizare cunoscută la vertebrate. De asemenea, nu este încă bine precizată existența la acest nivel a unor celule cu funcții imune similare celor de la vertebrate.



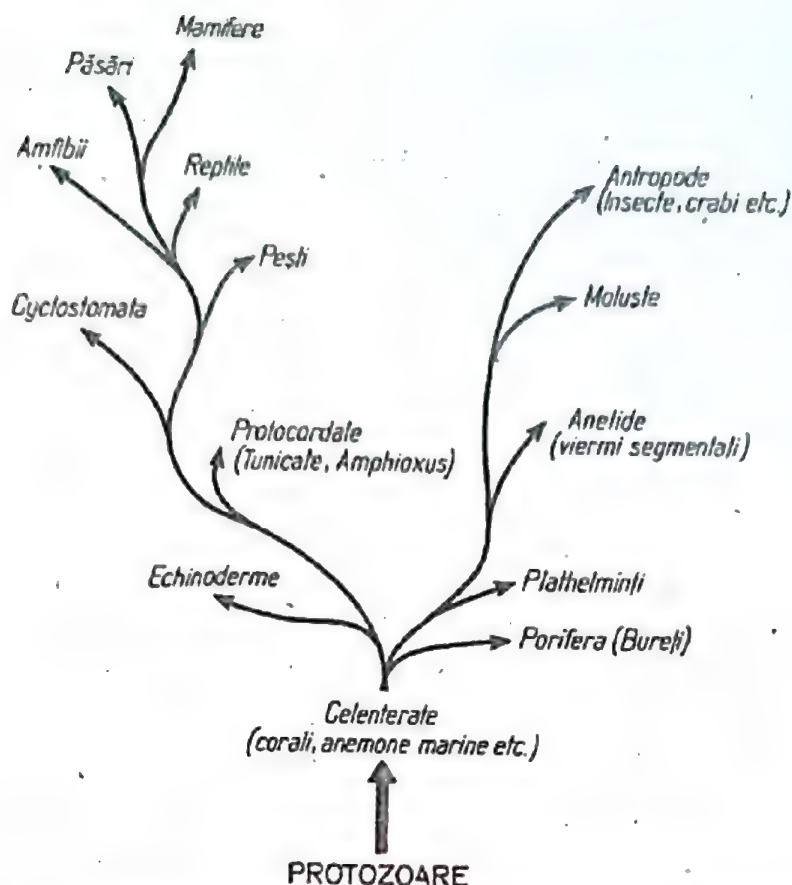


Fig.194. Evoluția regnului animal de la ființe unicelulare până la mamifere.

Se pare că organismele multicelulare primitive au celule de apărare capabile să recunoască și să răspundă la semnalele primite din partea propriilor țesuturi afectate. Ar fi o dublă funcție, de "apărare" și de "reparare" tisulară care în fond menține homeostazia. În acest scop, aceste celule au capacitate adezivă, probabil fiind înzestrate cu forme arhaice de molecule de adeziune și posibilități de deplasare, adică, "capacități locomotorii" puse în mișcare de factori solubili care fac posibilă recunoașterea leziunii și repararea ei prin celule de apărare.

Celenteratul marin *Anthopleura elegantissima* este capabil de recunoaștere alogenică rapidă, iar *Botrylos*, o colonie de tunicate, manifestă existența unor locus-uri de histocompatibilitate care dezvoltă "specificități de colonie". Membrii unei colonii sunt expulzați de membrii altor colonii. S-a postulat că atât la tunicate cât și la sperma umană se face recunoașterea și penetrarea celulelor proprii speciei prin intermediul unor molecule de suprafață de genul celor MHC. În hemolimfa insectelor există lizozim bacteriolitic, peptide bactericide, proteine bacteriostatice, factori inductibili proteici, cu greutate moleculară mare (600 - 700 kD) care mimează activitatea imunologică a moleculelor de anticorpi, inclusiv existența unui rudiment de memorie imunologică.

Se știe însă că nevertebratele nu reacționează la stimulii antigenici prin sinteză de anticorpi de natura celor existenți la mamifere și că nu au memorie imunologică. Pe baza acestor criterii, s-ar putea afirma că aceste viețuitoare nu posedă capacitatea de a dezvolta răspuns imun. Totuși, ele au celule care recunosc "non-propriu" fagocitându-l, funcție de apărare esențială la acest nivel evolutiv, care se menține în continuare pe toată scara evolutivă, fără a-și pierde din importanță. Faptul, că la mamifere antigenul odată pătruns în organism declanșează ca primă reacție de apărare funcția fagocitară, poate reprezenta o "amintire"

rămasă din timpuri imemorabile, când fagocitoza era unica formă de apărare imună. Dar, la unele specii de nevertebrate este semnalată, după cum spuneam, și existența altor reacții imune. Astfel, la râmă, în 50% din grefele de tegument se înregistrează reacție în decurs de 18 - 20 de zile în cazul în care tegumentul grefat provine de la aceeași familie. Procentul reacțiilor de eliminare crește dacă grefa se face între indivizi care aparțin unor grupe mai îndepărtate. Mai mult, eliminarea grefei este adesea însoțită de o infiltrație la locul reacției cu celule asemănătoare limfocitelor.

Nevertebratele reacționează la non-propriu mai ales mediat celular, începând cu fagocitoza primitivă de la amoebe și culminând cu existența unor populații de celule de la coelomate, poate impropriu denumite "imunocite". La echinoderme, moluște și artropode a putut fi identificată chiar existența de imunocite cu caractere diferite, un gen de "subclase" cu densitate diferită, cu conținut diferit de granule citoplasmice bogate în enzime și cu potențial de legare a unor lectine. Aceste imunocite ar fi capabile de agregare, locomotie și fagocitoză. Totuși, trebuie multă prudență în considerarea reacțiilor de grefă și caracterelor diferite ale "imunocitelor" ca fenomene biologice asemănătoare, analoage celor existente la mamifere (tabelul 104).

Tabelul 104

Unele caracteristici generale ale imunocitelor de la nevertebrate  
și ale limfocitelor mamiferelor

Caracterul considerat	Prezența caracterului	
	Mamifere	Nevertebrate
Originea mezemchimală a celulelor imune	+	-
Existența de organe ca sediu al celulelor limfoide (timus, splină etc.)	+	-
Prezența funcțiilor mediate celular (T)	+	- (?)
Existența funcțiilor mediate umoral	+	- (?)
Cooperări celulare în reacțiile imune	+	-
Morfologie celulară nediferențiată (a limfocitelor sau celulelor similare)	+	+
Citoplasmă agranulară	+	- (?)
Prezența markerilor de membrană	+	- (?)
Prezența receptorilor pentru antigene	+	-

Datele se referă la limfocitele de șoarece considerate ca prototip al celulelor de mamifere, deoarece au fost cele mai bine studiate.

Tot la râmă, la rac etc. ar exista și unele forme primitive de reacții anafilactice. La diverse specii de nevertebrate a fost descrisă existența unui răspuns protector specific față de antigenele bacteriene și a unor heteroaglutinine capabile să se combine cu structuri de pe suprafața eritrocitelor mamiferelor. Studiile electroforetice ale lichidului celomic sau vascular nu au pus în evidență existența unor proteine care migrează în regiunea gammaglobulinelor. Totuși, se pune întrebarea dacă acest criteriu este absolut obligatoriu? Pe baza caracterelor fizico-chimice ale unor molecule de hemaglutinine cu greutatea 390 kD și



constanta de sedimentare de 13,5 S, care migrează în regiunea beta, au fost identificate cca. 18 subunități care în unele porțiuni ale moleculei aveau aceeași structură primară. Datele ar sugera că aceste lanțuri ar fi strămoșii lanțurilor de imunoglobulină cu secvențe constante și variabile. Mai mult, dintre aceste subunități, una are aceeași mărime ca și lanțul L de la mamifere.

Aglutininele naturale, deși au o oarecare specificitate la vertebrate nu cresc ca titru după stimulul cu hematii, iar substanțele umorale au un spectru funcțional limitat și o cinetică diferită de cea existentă la nevertebrate. După "imunizare" protecția apare foarte rapid, dar și durează un timp extrem de scurt (doar câteva zile). Nu este exclus ca aceste aglutinine să reprezinte forme primitive de imunoglobuline. De asemenea, nu este exclus ca la aceste viețuitoare să joace un rol important în apărare și liza dependentă de complement.

La echinoderme ar exista celule fagocitare care ar avea receptori pentru molecule similare componentelor C 3b ale complementului, și un sistem litic umoral cu caracteristici proprii celui generat de complement la mamifere. Hemolimfa insectelor reacționează cu veninul de cobră producând o convertază C 3, care clivează componenta C 3a generând C 3b. Mai mult, a fost semnalată existența unor factori umorali similari citokinelor, sintetizați de către imunocitele nevertebratelor și potenți funcțional *in vitro* față de limfocitele mamiferelor. Semnificația acestor constatări este încă obscură. Dar, se poate afirma că la nevertebrate există un tip rudimentar de apărare pe care l-am putea denumi "pseudoimun" și care se manifestă prin îndepărtarea non-propriului atât mediat celular prin intermediul celulelor fagocitare, cât și printr-un rudiment de reacții mediate umoral (aglutinine nespecifice), care însă nu sunt analoage celor de la vertebrate. Principala lor formă de apărare rămâne totuși cea fagocitară. Rămâne de văzut dacă restul mijloacelor de apărare prezente la unele specii (hemaglutinine, lizine etc.) sunt artefacte sau simple excepții de la regula generală.

#### IMUNITATEA LA VERTEBRATE

Schematic, evoluția vertebratelor este următoarea: o încrengătură (*Craniota*) cu două subîncrengături (*Agnatha* și *Gnatosthomata*).

Subîncrengătura *Agnatha* include ordinele *Mixinoide* și *Petromyzontia*, vertebrate fără maxilare, cu corp vermiform și scheletul redus la o coadă dorsală (fig. 195). Vertebrele lipsesc complet.

Subîncrengătura *Gnatosthomata* cuprinde vertebratele cu maxilare, și anume supraclasa *Pisces* cu clasele *Chondrichtes* și *Osteichtes*, derivate dintr-o clasă dispărută (*Placodermes*). Clasa *Chondrichtes* cu subclasa *Elasmobranchii* și ordinele *Selacieni* și *Batoidea* își mențin structura cartilaginoasă a scheletului. Clasa *Osteichtes*, din care fac parte peștii osoși, a evoluat spre două direcții principale: una, care a mers spre direcția subclasei *Teleosteeni*, din care fac parte cca. 11 500 de specii din totalul de 12 000 de specii existente astăzi, cuprinde clasa *Actinopterygii*, ordinul *Chondrosteeni*, din care fac parte peștii osoși, cu scheletul complet osificat dar cu craniul cartilaginos, subclasa *Holosteeni*, formă de tranziție spre subclasa *Teleosteeni* cu scheletul complet osificat. Altă ramură are la bază clasa *Choanichthyes* ai căror reprezentanți au o formă superioară de organizare, și anume un gen de orificii nazale interne (choane). Din aceștia descind patrupelele inferioare și superioare, respectiv amfibiile, reptilele, păsările

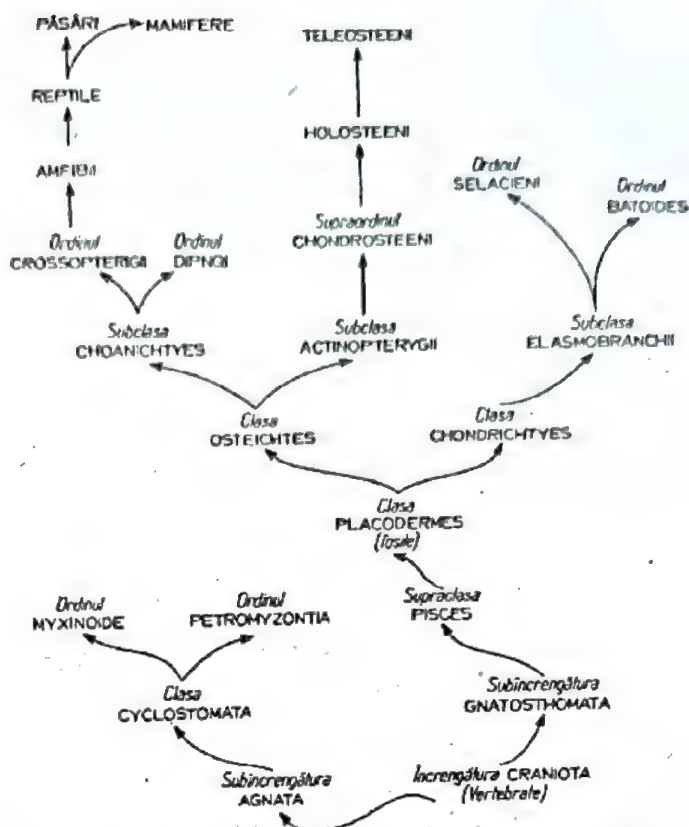


Fig.195. Direcții în evoluția filogenetică a vertebratelor.

și mamiferele. La unele, cum ar fi o parte din reptile, membrele există ca rudimente, iar la altele, cum ar fi păsările, membrele anterioare sunt transformate în aripi.

Paralel cu evoluția vertebratelor, se dezvoltă și sistemul lor imun. Cele mai primitive dintre acestea, *Cyclostomii*, au avea o splină eritropoietică rudimentară și celule similare limfocitelor, prezente în circulație și participante la reacțiile inflamatorii. *Myxinoidele*, aflate în condiții de viață obișnuite (temperaturi în jur de  $+10^{\circ}\text{C}$ ), nu rejectează homogrefele. La temperaturi mai ridicate, sunt capabile de rejectie și de sinteză de anticorpi.

*Petromyzontia* au celule limfoide în epiteliul faringian, considerate ca un rudiment de timus primitiv, splină limfopoietică, limfocite mici, mijlocii și mari (aflate în diverse stadii de maturare), dar nu au plasmocite. Aceste viețuitoare pot dezvolta reacții imune față de diverși stimuli antigenici, exprimate prin rejectii de grefă, reacții alergice de tip întârziat, memorie imunologică. Sunt considerate ca cele mai primitive vertebrate la care s-a putut identifica existența unui răspuns imun adaptativ.

*Elasmobranhiile inferioare* (Selacieni sau rechinii interiori) au un sistem limfoid mai dezvoltat, alcătuit din timus organizat (medulară și corticală) care nu involuează cu vârsta, precum și din splină, focare limfoide prezente la nivelul intestinelor, gonadelor și parenchimului renal. Au limfocite circulante, dar nu au plasmocite.

*Elasmobranhiile superioare* (Batoidea sau rechinii plăți), au splina alcătuită din pulpa albă și roșie, țesutul limfoid este abundent, apar plasmocitele identice cu cele de la mamifere. Timusul involuează o dată cu vârsta.

*Heterodontus francisci* (rechinul cornos) este cea mai primitivă vertebrată la care sunt molecule de anticorpi formate din lanțuri legate între ele prin legături disulfidice. Lanțurile grele sunt codificate de unități transcripționale VDJC, care la mamifere sunt asamblate din segmente genice separate. La rechin, mănunchiul



de gene *VDJC* a suferit o duplicare care a permis generarea diversității de gene  $V_H$  codificate în linia germinativă. La aceste animale sunt câteva sute de gene pentru lanțul *H*, structura lor reflectând forma ancestrală atât pentru imuno-globuline, cât și pentru receptorul pentru antigen de pe limfocitul *T* al mamiferelor.

La vertebratele din clasa *Osteichthes* (*Chondroteeni* sau sturioni, *Holosteeni* sau peștii ganoizi osoși și *Teleosteeni* sau pești osoși) timusul este definitiv organizat. Este alcătuit din lobi, lobuli, timocite și involuează o dată cu vârsta. Splina are pulpa roșie și colecții dense de limfocite abundente, în care sunt prezente și celulele plasmatiche. Pericardul are un țesut hematopoietic similar măduvei osoase de la mamifere și, probabil, este locul de generare a celulelor sușă. Limfocitele sunt capabile de recunoașterea și migrarea în arii specifice, deci de ecotaxie, speciile aparținând acestei clase putând dezvolta atât răspuns imun primar cât și secundar față de numeroase antigene, dovadă că memoria imunologică la acest nivel de dezvoltare este perfectă.

La amfibii și reptile încep să apară ganglioni limfatici primitivi, formați din foliculi limfatici încapsulați, acumulări de limfocite mici și mijlocii în regiunea sublinguală, un fel de amigdale primitive, precum și celule plasmatiche în "lamina propria" a intestinului, precursori ai limfocitelor care vor deveni secretoare de IgA la speciile mai evoluate.

Păsările au un sistem imun dublu celular, derivat din timus și din bursa lui Fabricius. Este prima dată când apar aceste două organe limfoide centrale, care vor instrui populațiile de celule *T* și *B* înzestrate cu funcții imune distincte. Pot sintetiza anticorpi din clasele IgM, IgG, în mai slabă măsură din clasa IgA, dar nu și din clasa IgE, reacțiile anafilactice lipsind la acest nivel evolutiv. Se știe că celulele timice sunt relativ mai independente în exercitarea funcțiilor lor imune, ele ajutând, dar fiind mai puțin ajutate de către celulele *B*. Această independență funcțională ar putea fi o expresie a priorității lor pe plan evolutiv. Precursorii timusului apar primii în fiologie, încă de la nivelul ordinului *Petromyzontia*, pe când cei ai bursei lui Fabricius, probabil la *Elasmobranchii*, unde glandele rectale sau eventual sacul anal de la amfibii ar putea fi strămoșii acestui organ. Această speculație de ordin teoretic pare a fi susținută și de faptul că timectomia în stadiul larvar la amfibii inhibă sinteza anticorpilor din clasele IgM și IgG, în timp ce la mamifere, sinteza IgM consecutiv timectomiei se menține la valoare aproape normală. Dacă cele două clase de imunoglobuline de la amfibii sunt distincte, atunci influența timectomiei asupra sintezei IgM la aceste viețuitoare s-ar explica prin aceea că timusul are un rol important în controlul producției de anticorpi la această treaptă de evoluție filogenetică sau, altfel spus, acum ar apărea strămoșii limfocitelor *T* supresoare.

Ca și timusul la vertebratele inferioare, bursa persistă toată viața la păsările primitive, dar involuează o dată cu vârsta la speciile mai evoluate. În afară de organele limfoide primare, păsările și mamiferele au un sistem limfoid secundar (splină, ganglioni limfatici etc.) la nivelul căruia diferențierea celulară este influențată de prezența antigenului.

Deoarece în cercetarea imunologică structura și funcțiile imunoglobulinelor au fost investigate prioritar, este firesc ca și apariția lor pe scară filogenetică să fie mai bine cunoscută. O formă primitivă de molecule similare imunoglobulinelor ar apărea la *Cyclostomi*. Dacă la nevertebrate nu se poate vorbi de existența unor structuri moleculare similare anticorpilor, ci doar de subunități proteice asemănătoare lanțului *L*, la peștii primitivi stimulul antigenic induce formarea de anticorpi cu o migrare electroforetică eterogenă, în regiunile  $\alpha$ ,  $\beta$  și  $\gamma$  și cu diferite constante de sedimentare, de la 6,6 S până la 14 S. Se pare că formele 7 S și 14 S sunt identice și similare ca structură, reprezentând forme monomerice și polimerice ale aceleiași clase de proteină, situație întâlnită de altfel și la ver-



tebratele superioare. Molecula este formată din patru lanțuri polipeptidice, ceva similar cu două lanțuri *L* și două *H*, cu legături necovalente *L-H* și *H-H*, dar fără legături disulfidice între lanțurile *L* și *H*. Greutatea moleculară a anticorpilor 7 S este 188 kD, deci foarte apropiată de cea a mamiferelor, din care, lanțul *H* are greutatea de cca. 70 kD, cu mobilitatea electroforetică a lanțului  $\mu$  de la mamifere, iar lanțul *L* are greutatea de 24 kD. Aproape 30% din imunoglobuline sunt reprezentate de lanțul *L*, dintre care unele au extremitatea  $\text{NH}_2$  terminală cu resturi de acid aspartic.

Spre deosebire de Cyclostomi, *Elasmobranhiile* posedă două tipuri de imunoglobuline; un tip 17 - 19 S care apare după stimulul antigenic primar și se menține în circulație mai multe luni, și un tip 7 S, sintetizat după stimulul secundar. Dar, spre deosebire de păsări și mamifere, anticorpii 19 S și 7 S nu reprezintă clase separate de imunoglobulină ci mai degrabă proteine strâns înrudite aflate sub controlul unei gene unice. Ambele au un procent ridicat de hidrați de carbon, iar lanțurile *H* și *L* sunt distincte ca mărime, secvența în aminoacizi și proprietăți antigenice. Se pare că ar fi polimeri ai acelorași proteine, care diferă numai prin greutatea lor moleculară. Conținutul ridicat de hidrați de carbon al lanțului *H*, greutatea moleculară a acestui lanț și a întregii molecule, precum și mobilitatea electroforetică a proteinei 17 - 19 S de la *Elasmobranhii*, sunt foarte asemănătoare cu IgM de la mamifere. Cu toate acestea, cele două proteine nu sunt identice. Astfel, numărul situsurilor combinate la proteina *Elasmobranhiilor* este mai mare decât cel existent pe molecula IgM.

Nu se știe dacă aceste situsuri recunosc într-adevăr antigenul sau au alte semnificații. Ar putea fi doar un tip de proteină funcțională care nu s-a mai păstrat la formele de viață evolute.

La *Osteichthes*, datele sunt insuficient cunoscute. După stimulul antigenic primar, răspund prin formarea de anticorpi 19 S care, după mai multe luni, sunt înlocuiți cu 7 S. Proteina intactă 19 S, deci IgM, are greutatea moleculară 900 kD, lanțuri  $\mu$  cu greutatea 70 kD și lanțuri *L* cu greutatea de 20 - 23 kD. Molecula de proteină 7 S, similară clasei IgG, are greutatea 120 kD, iar lanțurile *H* și *L* greutăți de 40 kD, respectiv 20-22 kD. Din punct de vedere antigenic, determinanții existenți la nivelul anticorpilor 7 S sunt prezenți și la nivelul celor 19 S. Greutatea moleculară diferită a lanțurilor *H* aparținând celor două tipuri de molecule, precum și afinitatea lor diferită pentru antigene ar pleda pentru existența la peștii evoluți a două clase de imunoglobuline: una IgM și alta IgG. Nu este însă exclus ca să fie vorba doar de simple diferențe de afinitate a unor molecule diferite și nu de o diferență reală a posibilităților de recunoaștere a antigenelor.

La peștii Teleosteeni se găsesc populații distincte de limfocite *B* și *T* iar macrofagele funcționează ca celule accesorii care secretă IL-1 similară dar nu identică funcțional și chimic cu cea a mamiferelor.

La amfibii (broaște, salamandre etc.), după stimulul antigenic primar apare o macroglobulină 19 S, care după 2-3 luni este înlocuită cu o moleculă 7 S. Caracterele antigenice și structurale ale acestor molecule pledează pentru existența a două clase de imunoglobuline la acest nivel evolutiv.

Reptilele (broasca țestoasă, șopârla, aligatorul etc.) au tot două clase de imunoglobuline (19 S și 7 S) care, spre deosebire de cele de la mamifere, nu-și modifică în cursul imunizărilor aviditatea și afinitatea pentru antigene. Probabil, că la reptile există un număr de clone celulare mai mic decât la mamifere, antigenele antrenând limfocite cu receptori care au aceeași capacitate de legare, fără posibilitatea recunoașterii încrucișate a determinanților antigenici înrudiți.

Păsările, după stimulul antigenic primar, sintetizează anticorpi IgM similari celor de la mamifere. La Galinaceae acești anticorpi au o durată de viață relativ scurtă, sunt sensibili la 2-mercaptoetanol și migrează electroforetic în aceeași



regiune ca și cei de la mamifere. De altfel, și anticorpii IgG sunt similari cu cei ai mamiferelor: au aceeași greutate moleculară, constantă de sedimentare etc. În schimb, IgG de la păsări au o concentrație de 2-3 ori mai mare de hidrați de carbon și sunt sensibili la acțiunea pepsinei. Nu se știe dacă la găini sunt mai multe clase; ar exista o imunoglobulină care migrează în regiunea  $\gamma 1$  și care ar putea fi similară cu IgG1 de la mamifere. Imunoglobulinele la găină au o particularitate deosebită, și anume aceea că precipită mai bine când reacționează cu antigenul în medii cu un conținut bogat de NaCl (1,5 M), decât în ser fiziologic simplu. Se pare că la păsări, NaCl agregă molecule de IgG, pe suprafața agregatului apărând un număr mai mare de situsuri combinate, care fac să crească considerabil capacitatea de precipitare a antigenului. Totodată, coprecipită și o componentă normală din ser, o macroglobulină lipoproteică, care este capabilă să lege complexe solubile adăugând precipitatului și propria ei greutate. Spre deosebire de găină, la mamifere, concentrațiile mari de NaCl au un efect de djsociere asupra legăturilor antigen-anticorp. La rată, se cunosc trei clase distincte de imunoglobulină; o clasă 19 S similară clasei IgM de la mamifere, o clasă IgG cu constanta de sedimentare 7,8 S și alta cu constanta 5,7 S. Aceste două clase sunt înrudite, dar nu sunt identice între ele; diferă la constantele de sedimentare, la migrarea electroforetică și la comportamentul față de papaină.

La mamifere sunt 5 clase majore cu diverse subclase, imunoglobulinele IgG constituind clasa majoră. Dar chiar și la acest nivel, există diferențe între specii, condiționate de gradul lor de evoluție: unele specii au un număr mai mare de subclase IgG decât altele, clasa IgA este mai bine exprimată, pot exista chiar și clase de anticorpi cu caractere particulare, cum este cazul la cal. Calul are componentul T, un anticorp cu constanta de sedimentare 10 S, care apare în ser după imunizări cu polizaharizi pneumococici sau alte antigene înrudite cu aceștia. Electroforetic migrează în regiunea betaglobulinelor, are un conținut ridicat de hidrați de carbon și diferă antigenic de celelalte subclase de imunoglobuline. Inițial s-a crezut că ar reprezenta clasa IgA, dar faptul că secvența aminoacizilor la nivelul regiunii constante a lanțului este omoloagă celei din clasa IgG a acreditat ideea că această componentă ar fi totuși o subclasă de molecule IgG.

Date interesante au fost obținute datorită studiilor secvențelor aminoacizilor la nivelul lanțurilor H și în special L în evoluția filogenetică.

Există unii aminoacizi "cheie", cum ar fi cisteina, care asigură legăturile disulfidice interlanț și care sunt prezenți aproape la toate speciile de vertebrate, indiferent de poziția pe care o ocupă pe scara evolutivă. Totuși, o dată cu evoluția, secvența aminoacizilor (care la vertebratele inferioare este practic identică la lanțurile H și L) începe să difere, lanțul H devenind mai lung, cu un număr de aminoacizi mult mai mare și cu o structură antigenică diferită de la specie la specie și de la clasă de imunoglobulină la clasă.

Structura lanțului L însă este mai puțin modificată, fiind oarecum similară la toate vertebratele, de la cele mai primitive până la cele mai evoluat. De exemplu, este un înalt grad de asemănare între lanțul L al peștilor și cel L $\kappa$  al omului. Mai mult, lanțul L $\kappa$  este aproape identic cu L $\kappa$  de șoarece, dar diferit de L $\lambda$  de om. La toate mamiferele există lanțurile L $\kappa$  și L $\lambda$ , excepție de la această regulă făcând doar calul și nurca. Raportul L $\kappa$ /L $\lambda$  variază de la specie la specie, fie în favoarea L $\kappa$ , cum este cazul la șoarece sau om, fie în favoarea L $\lambda$ , speciile strâns înrudite având raportul identic sau foarte apropiat. Toate acestea ar sugera că genele care controlează sinteza lanțurilor derivă dintr-un strămoș comun. Inițial, o genă primitivă ar fi codificat sinteza unui lanț peptidic de cca. 106 aminoacizi, egal în lungime cu jumătate din lanțul L, deci cu o greutate moleculară de 11-12 kD (fig. 196).







primit: sub restricție MHC sau în afara acestei restricții. Așa s-ar explica de ce o celulă *T*, generată ca răspuns la un stimul antigenic specific, ucide inițial sub restricție MHC, iar ulterior, în afara acestei restricții. Fenomenul a fost observat pe culturi de limfocite *in vitro* și s-a dovedit clar că celula citotoxică este într-adevăr limfocit *T*, deoarece anticorpii anti-CD3 anulau efectul citotoxic. După alții, CD45 ar fi o structură potențială de activare a citotoxicității în afara restricției MHC, iar IL-2 secretat de către limfocitele *T* ar putea activa exprimarea unor molecule de adeziune ca CD11a/CD18, CD54 (ICAM-1) și CD2 pe celulele *NK*. De asemenea, activarea exprimării unor astfel de molecule pe limfocitele *T* le-ar permite să interacționeze cu un spectru mai larg de ținte și ar explica în parte de ce se amplifică potențialul de citotoxicitate a limfocitului *T* în prezența unor concentrații mari de IL-2. Acestea, cultivate în prezența de IL-2 ar efectua funcții citotoxice fără restricții MHC, similare celor *NK*. Nu se cunoaște însă dacă această capacitate de citoliză este proprie tuturor limfocitelor *T* sau numai unor anumite celule din această clasă. În orice caz, efectoarele *NK* ar reprezenta o formă primitivă de celule citotoxice în comparație cu cele *Tc* care, deși se leagă la țintă prin interacțiuni receptor-ligand de genul CD 2-LFA 3 sau LFA 1-ICAM 1, ar fi lipsite de un receptor specific sofisticat, de genul celui existent la limfocitul *T* sau *B*. Acești receptori "sofisticați" ar fi molecule adăugate în cursul evoluției filogenetice, care au fost asociați unor receptori monomorfici mai vechi, de genul CD 2 sau LFA-1, prezenți pe *NK*, dar rămași activi și la nivelul limfocitelor *Tc* unde funcționează ca "receptori accesorii". Așadar, limfocitele *T* citotoxice, în special cele cu receptori  $\gamma\delta$  ar reține "funcția ancestrală *NK*" putând fi implicate în recunoaștere în afara restricției MHC, la care s-au adăugat funcții de recunoaștere noi și mult mai eficiente.

Studiul reacțiilor imune la vertebrate este o sursă importantă de informații care ar putea deveni utilă descifrării unor necunoscute în sfera apărării imune a omului, nu numai față de agresori externi, dar chiar și în situații de autoagresiune. De exemplu, metamorfoza amfibilor și toleranța formelor intermediare față de antigenele adulte ar putea contribui la explicarea mecanismelor prin care funcțiile imune mediate celular sunt influențate și în corelație cu reglarea neuroendocrină.

## ONTOGENIA IMUNOCOMPETENȚEI

Studiile efectuate pe embrionii de oaie, găină, șoarece, opossum etc. demonstrează că păsările și în special mamiferele își dobândesc imunocompetența față de diferite antigene la stadii diferite de dezvoltare în ontogenie. Maturarea imunologică, privită din acest punct de vedere, apare ca un proces extrem de bine reglat, alcătuit din "momente" precise de dobândire a competenței, când fetusul se dovedește capabil să dezvolte reacții imune față de un anumit antigen, dar este total indiferent față de alte antigene. Această receptivitate diferențiată față de antigene nu este condiționată în exclusivitate de exprimarea receptorilor pentru unii epitopi de pe suprafața membranei unor clone de limfocite *T* sau *B* și lipsa de exprimare a receptorilor pentru alți epitopi deoarece, în cazul limfocitelor *B* de exemplu, clonele predestinate să reacționeze cu diverși epitopi își exprimă receptorii specifici cu mult înainte de sinteza anticorpilor.

Dacă la păsări ovulul fecundat întrerupe orice legătură de ordin anatomic sau fiziologic cu organismul matern, procesul de formare a embrionului și de ecloziune având loc în afara acestuia, la mamifere, atât înainte cât și imediat după naștere, produsul de concepție este mai mult sau mai puțin dependent din punct de vedere



imunologic de protecția conferită de către mamă. De aceea, dezvoltarea în ontogenie a sistemului imun la mamifere se face atât în contextul relațiilor materno-fetale, cât și în afara acestora. Cu alte cuvinte, fătul își dezvoltă propriul sistem imun la adăpostul și sub controlul mijloacelor de apărare maternă.

#### RELAȚIILE MATERNO-FETALE

O problemă spinoasă, nesatisfăcător explicată, este cea a toleranței fetale. Încă nu se știe precis cum este posibil ca un organism, care posedă 50% din antigenele MHC moștenite de la un părinte, să fie tolerat luni de zile de către organismul matern. Pentru explicarea acestui paradox imunologic au fost postulate mai multe ipoteze care susțin că: antigenele fetale sunt slab dezvoltate, placenta acționează ca o barieră anatomică între mamă și făt sau că reacțiile imune ale mamei sunt depresate în cursul sarcinii, de unde incapacitatea ei de a recunoaște și elimina grefa fetală. Totuși, numeroase date experimentale au demonstrat că nici una dintre aceste ipoteze nu este riguros exactă. Lucrările din ultimele decenii au stabilit precis că antigenele MHC sunt exprimate foarte de timpuriu pe suprafața celulelor fetale, și că *in vitro* pot stimula limfocitele materne care le recunosc ca străine și reacționează specific față de ele. Faptul că *in vivo*, în mod normal, aceste reacții au loc s-ar datora existenței barierei placentare care ar izola fătul de mamă, astfel încât stimulii antigenici fetali nu mai sunt accesibili sistemului imun matern. Dar, numărul straturilor placentare care formează această barieră diferă de la o specie la alta. La unele specii, la care placenta are un număr mai mare de straturi, izolarea fătului de mamă este mai bună, în timp ce la altele, cu un număr mai mic de foițe placentare, este mai slabă. În prima situație, principala cale de acces a anticorpilor protectori de la mamă la produsul de concepție este cea colostră, iar în cea de a doua, cea placentară. Dar, atât prin placenta cât și prin colostru, în afară de anticorpi trece un număr considerabil de macrofage, limfocite, granulocite etc. Dacă placenta nu este o barieră perfectă, înseamnă că intervin factori supresori, care frânează multiplicarea și reacțiile limfocitelor materne. Numeroase observații au implicat foia trofoblastică a placentei ca responsabilă de realizarea barierei. Celulele sale sunt neantigenice deoarece nu exprimă pe suprafața lor aloantigene, fiind deci "un țesut privilegiat imunologic". Pe de altă parte, atât mama cât și fătul produc factori depresori ai reacțiilor imune.

În sarcină ar fi un echilibru inversat între limfocitele  $T_{H1}$  și cele  $T_{H2}$  și, deci, între citokinele IL-2 și  $IFN\gamma$  secretate de către  $T_{H1}$  și IL-4, IL-5, IL-10 secretate de către  $T_{H2}$ . Primele, stimulând imunitatea mediată celular, inhibă proliferarea  $T_{H2}$  și tolerarea fătului de către organismul matern. La rândul lor, limfocitele  $T_{H2}$  inhibă profund sinteza limfocinelor de către  $T_{H1}$  și favorizează acceptarea fătului.

Inocularea la șoarece de IL-3, G-CSF, GM-CSF stimulează creșterea și diferențierea trofoblastelor, măbind supraviețuirea fetoșilor, pe când inoculul de IL-2,  $IFN\gamma$  sau TNF are efecte vătămătoare asupra acestora.

La femeia gravidă, reacțiile imune mediate celular sunt depresate, în timp ce imunitatea umorală este activată. Așa se explică de ce în sarcină artrita reumatoidă se ameliorează clinic, iar sinteza de anticorpi față de unii stimuli antigenici este mult mai mare în comparație cu răspunsul femeilor normale expuse aceluiași stimuli antigenici. În esență, nașterea ar fi o expresie a scăderii rapide a sintezei



de către  $T_H2$  a citokinelor IL-4, IL-5 și IL-10 și o activare a funcțiilor secretorii ale limfocitelor  $T_H1$  cu eliberare de IFN $\gamma$ , IL-2 etc.

Pe lângă schimbările hormonale ce au loc în această perioadă la femeie și care pot controla nespecific aceste reacții, apare o serie de molecule de  $\alpha$ - sau  $\beta$ -globuline cu rol imunoreglator. Și fetusul poate produce substanțe imunoreglatoare de genul alfa-feto-proteinei sau fetuinei, a căror concentrație mare în lichidul amniotic și în plasmă interferă cu diverse funcții imune, inclusiv cu cele ale limfocitelor  $T$  citotoxice. Alături de acești factori moleculari, la fetus predomină limfocitele  $T$  supresoare, care inhibă proliferarea limfocitelor maternelor. Deci, interacțiile materno-fetale sunt extrem de complexe și multifuncționale. Pe de o parte ele conferă protecție organismului în formare, iar pe de altă parte, îi creează toate condițiile necesare dezvoltării sistemului imun propriu. Protecția vizează atât izolarea biologică față de agresiunea celulelor imunocompetente maternelor, cât și izolarea față de agresiunea factorilor de mediu care au un acces limitat și controlat la produsul de concepție.

Fetusul primește anticorpii materni protectori predominant din clasa IgG, transferați activ datorită fragmentului  $F_c$ , care se fixează pe receptorul pentru  $F_c$  de pe trofoblast. Deoarece, în mod normal, el este apărat pe de o parte de anticorpii pe care-i primește pasiv iar pe de altă parte este izolat de stimulii antigenici externi, în prima jumătate a vieții intrauterine nu-și sintetizează anticorpi proprii, deși în mare măsură este capabil să o facă.

Experimentele pe fetuși de oaie, șoareci etc. au demonstrat fără echivoc că organismele în formare sunt parțial imunocompetente cu mult înainte de a se naște. Deci, multe componente ale sistemului imun, în stadiul fetal, pot recunoaște antigenele MHC, antigenele bacteriene, virale etc. și pot reacționa față de ele. Acest fapt este evident atât *in vivo*, cât și *in vitro*, unde influența factorilor supresori din organism poate fi înlăturată.

#### ONTOGENIA SISTEMULUI IMUN

Maturarea organelor și funcțiilor imune la mamifere începe încă din primele stadii de dezvoltare embrionară și continuă până în perioada perinatală, dobândirea imunocompetenței realizându-se pe două planuri diferite: pe cel al formării organelor limfoide și pe cel al maturărilor funcționale. Mai întâi se formează organele limfoide primare și ulterior cele secundare. Pot fi considerate organe limfoide specifice vârstei embrionare sacul vitelin și ficatul, la nivelul cărora se formează celulele sușă generatoare ale diferitelor linii celulare, inclusiv cea limfoidă. După cum se știe, din celula sușă și apoi din hemocitoblaștii dezvoltați în sacul vitelin și ulterior în ficatul embrionar, descind celulele care vor evolua pe direcția hematopoietică sau limfopoietică, din ultima derivând limfocitele care se vor matura fie la nivelul timusului, fie la nivelul măduvei osoase.

Rezultă două clase de celule a căror maturare ontogenică, respectiv dobândirea de markeri, de receptori și de competență funcțională se realizează în trei secvențe diferite: a) în stadiul premergător organului limfoid primar, deci pe parcursul de la celula sușă la timus sau măduva osoasă; b) în interiorul organelor limfoide și c) după ce au părăsit organele limfoide primare.

Limfocitele  $B$  de exemplu, la embrionul de șoarece recunosc secvențe bine precizate în dezvoltarea lor ontogenică. Un prim val de celule sușă invadează rudimentul de ficat, venind dinspre sacul vitelin în ziua a 9-a; al doilea val, în jurul

zilei a 10-a și continuă până aproape de momentul nașterii. La embrionul de 11-13 zile, apar în ficat limfocite pre-B mari, cu lanț  $\mu$  intracitoplasmatic care, după 2 - 3 zile, converg spre celulele B cu receptori imunoglobulinici (tabelul 105).

Tabelul 105

Prezența limfocitelor pre-B la șoarece ( $\mu^+$ ) în cursul vieții embrionare și postnatale

Organul	Vârsta embrionară (zile) la care sunt prezente limfocitele pre-B	Durata în zile a persistenței după naștere
Ficat	9 - 11	14
Splină	14 - 15	21
Oase lungi	16 - 17	Luni sau ani

După prima săptămână de la naștere, populația pre-B scade, iar la două săptămâni dispare total din ficat. În splină, celulele pre-B apar la 15 zile, ating maximum la naștere și dispar la cca. trei săptămâni de viață extrauterină. Și la celelalte specii de animale, precursorii B apar în ficatul embrionar, după care în măduvă, unde se găsesc practic toată viața. Se pare că există două modalități diferite de maturare a precursorilor: una aflată sub control strict genetic, independentă de intervenția stimulului antigenic și alta dependentă de acesta (fig. 197).

În cazul limfocitelor B și, poate, și în cel al limfocitelor T, între faza de control genetic și cea de intervenție a antigenelor, ar exista un stadiu intermediar în care intervin stimuli mitogenici. De exemplu, limfocitul B, odată derivat din hemocitoblast, devine precursor B care își sintetizează lanțul  $\mu$ . Acesta nu va fi exprimat la suprafața membranei, ci va rămâne în interiorul celulei. În stadiul următor, au loc

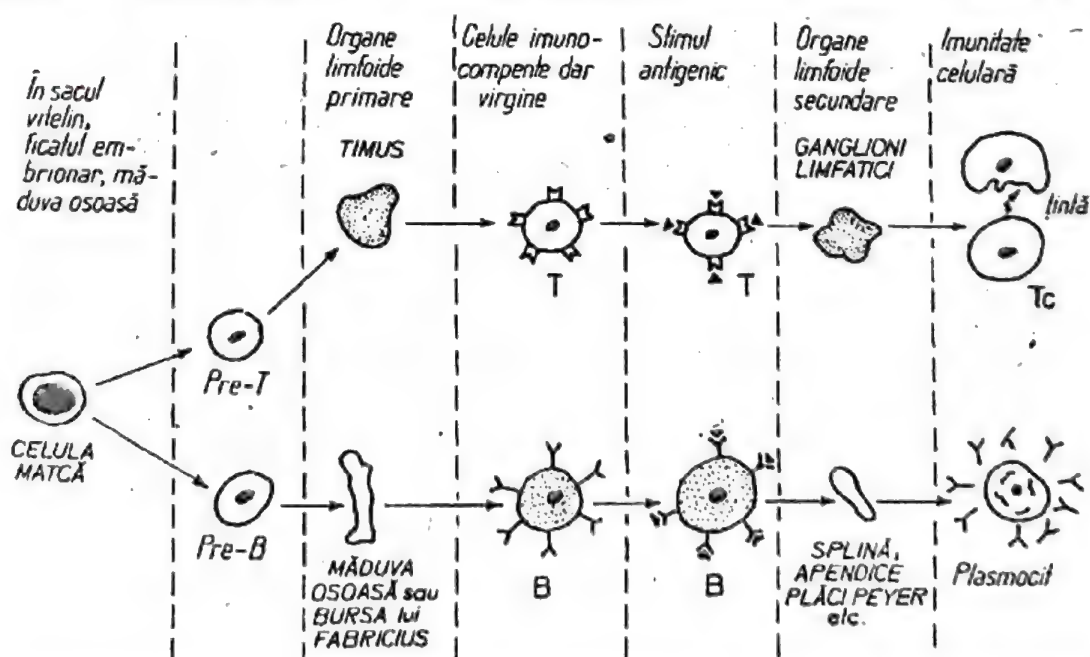


Fig.197. Evoluția ontogenică a limfocitelor T și B, de la stadiul de precursori pre-T sau pre-B până la stadiul final de celule efectoare T citotoxic (Tc) sau plasmocit.



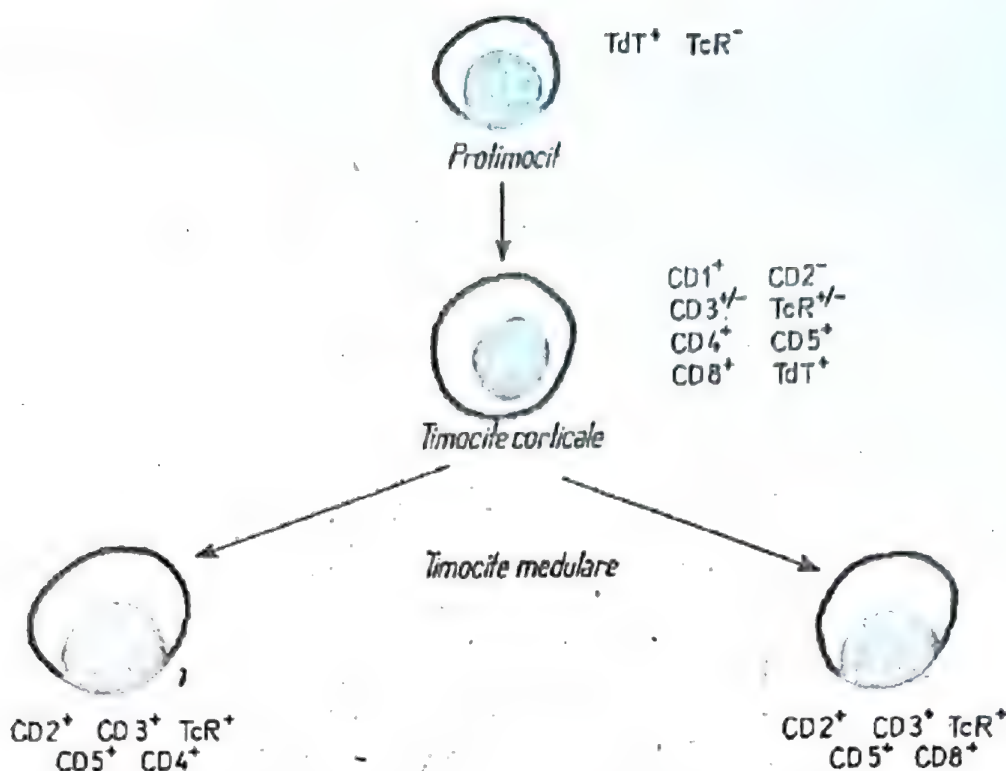


Fig.198. Evoluția ontogenică a limfocitului T. De la stadiul timpuriu de protimocit imatur funcțional, lipsit de receptori pentru antigen (TcR<sup>-</sup>) și bogat în enzima deoxiribonucleotidiltransferază (TdT<sup>+</sup>), celula T își capătă și pierde diferiți markeri până când ajunge la stadiul final de celule Th (CD4<sup>+</sup>) sau Ts (CD8<sup>+</sup>).

sinteza lanțului L și exprimarea la nivelul membranei a receptorului IgM. În această fază de dezvoltare, limfocitul este "incompetent" imunologic, un fel de "copil B" domiciliat la nivelul măduvei. Până acum, toate fazele evolutive sunt controlate genetic și independente de antigen. În stadiul următor, sub influența stimulilor mitogenici pentru care celula își are deja exprimați receptorii, apar receptorii pentru antigen din clasa IgD și, după caz, IgG sau IgA. Celula este deja competentă imunologic dar "virgină", în sensul că încă nu a avut prilejul să-și exprime competența dobândită. De abia sub influența antigenului și, după caz, a limfocitelor T ajutătoare, devine plasmocit secretor de IgM, IgG, IgA etc. La vârsta de 9-10 zile, embrionii au în sacul galben progenitorii B care trec în ficatul embrionar și apoi în măduva osoasă. La nivelul osului, progenitorii pre-B se găsesc în regiunea externă a măduvei, în imediata apropiere a peretelui osos, iar celulele B mature care exprimă deja receptorii IgM/IgD sunt localizate spre centrul măduvei. Nu se cunosc încă prea multe date referitoare la semnalele care generează evenimentele genetice și moleculare care acționează pentru declanșarea și exprimarea receptorilor pe suprafața membranei limfocitelor B. Se pare că o contribuție importantă la menținerea limfocitelor B în măduva osoasă ar avea-o macrofagele. De asemenea, pentru diferențiere, precursorii B foarte timpurii ar necesita unele condiții "mieloide", contactul direct cu celulele stromale fiind esențial pentru generarea și maturarea lor.

Markerii antigenici de pe suprafața limfocitelor sunt exprimați în secvențe diferite de timp în cursul evoluției ontogenice, unul și același marker putând dispărea într-o fază evolutivă și reapărea în alta, pentru ca în final să persiste numai cei care definesc populația de celule adulte (fig. 198).

Maturarea precursorilor T la nivelul timusului și modul de apariție a diferitelor subpopulații nu sunt încă bine cunoscute. Se știe că precursorii T sosii în timus

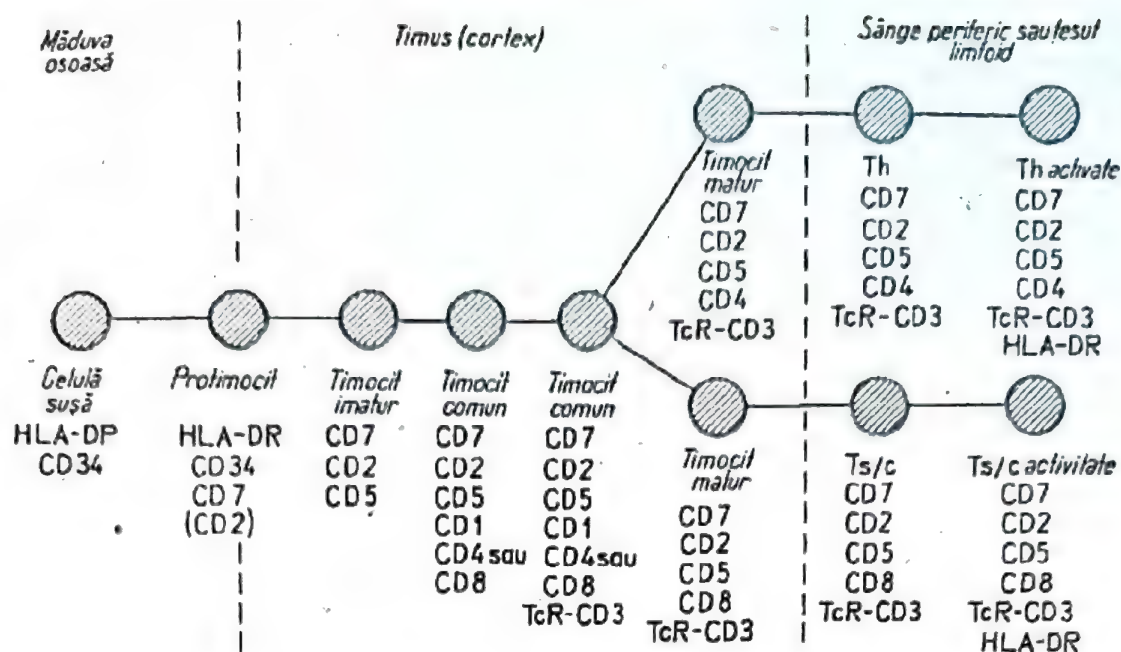


Fig.199. Schema ipotetică a diferențierii limfocitelor T umane în cursul evoluției ontogenice (după J.J.M. Van Dongen și col.)

nu au nici o funcție, până la maturarea lor existând mai multe etape în cursul cărora au loc achiziții și pierderi de caractere fenotipice. Acestea sunt expresia unor mutații în sinteza proteinelor care afectează secvența aminoacizilor și integritatea funcțională a proteinei. Celula T în cursul dezvoltării exprimă un număr diferit de antigene de suprafață care permit interacția cu microclimatul înconjurător, microclimat care-i va influența și regula dezvoltarea (fig. 199).

Diferențierea timocitelor începe de la precursorii timpurii  $CD3^-$ ,  $CD4^-$ ,  $CD8^-$  din regiunea subcapsulară, mergând spre formele imature  $CD3^-$   $CD4^+$   $CD8^-$ , sau  $CD3^-$   $CD4^-$   $CD8^+$  și apoi  $CD3^-$   $CD4^+$   $CD8^+$  în corticală, pentru ca, în final, să ajungă la forma matură  $CD3^+$   $CD4^+$  sau  $CD3^+$   $CD8^+$  din medulară. În cursul acestui proces este o relație complexă între celulele stromei timusului, precursorii limfocitari și citokine. Precursorii veniți din măduva osoasă intră în timus prin joncțiunea cortico-subcapsulară și cortico-medulară grație unor molecule chemoattractante cu rol de receptori ca  $CD44$  (integrina  $\beta 1$ ), un receptor care leagă acidul hialuronic,  $CD49d$  (VLA-4),  $CD49e$  (VLA-5) care asigură accesul în timus,  $CD49f$  (VLA-6) care aderă secvențial la un complex integrat de fibre de reticulină, laminină, fibronectină, glucozaminoglicani etc. Primul contact al precursorilor se face cu celulele endoteliului vascular. Sub influența microclimatului cortical timocitele modulează mai intens exprimarea  $CD25$  și  $CD44$  și apoi a  $CD4$  și  $CD8$ , ca o consecință a exprimării și rearanjării lanțului  $\beta$  al receptorului pentru antigen de pe limfocitul T. Migrarea în acest organ începe de la nivel subcapsular și are loc pe măsura diferențierii celulare în cursul căreia se realizează angajarea celulelor pe linia maturării, proliferării și rearanjării genelor TCR și exprimarea de receptori pentru citokine. Ea este mediată de către proteinele contractile (actină) și componentele matriței extracelulare ale celulelor stromale (FN, LM) care interacționează cu receptorii exprimați pe timocitele imature, favorizând aderența celulelor și interacțiuni secvențiale mediate de receptori de membrană și de coreceptori exprimați pe timocite și pe celulele din stroma timusului.

În nucleul celulelor limfoide imature, ca și în timocitele din corticala timusului este prezentă enzima deoxinucleotidil-transferază (TdT), care lipsește la





limfocitele *T* mature. Enzima are rolul de control al inserției nucleotidelor la situsurile de unire a segmentelor de gene, în timpul rearanjării genelor care controlează organizarea receptorilor pentru antigen pe suprafața celulei *T*. Precursorii limfoizi din măduvă exprimă atât HLA-DR cât și markerul *CD34*, la care se asociază ulterior *CD2* și *CD7* care se mențin pe tot timpul maturării limfocitului. Markerul antigenic *CD5* este prezent pe timocitele corticale și pe limfocitul *T* matur, pe când *CD 1* apare la precursorii din corticala timusului, fiind un marker "comun" pentru timocite. Multe timocite corticale sunt *CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>*, pe când cele din periferie sunt fie *CD4<sup>+</sup>*, fie *CD8<sup>+</sup>*.

Complexul *CD3-TCR* (*CDR<sup>+</sup>* receptorul pentru antigen pe limfocitele *T*) este exprimat pe 60 - 65% din populația de timocite normale, dintre care numai 0,2 - 1% exprimă receptori *Tγδ*. În periferie, majoritatea (85 - 95%) exprimă receptori *αβ*, iar 2 - 15 *γδ*. Deci, receptorii *Tγδ* se formează practic la nivelul măduvei osoase și nu la nivelul timusului, fapt care sugerează că celulele cu acești receptori suferă o diferențiere minoră în timus, de unde speculația că ele ar fi o reminiscență pe plan filogenetic care a apărut pe scară evolutivă înainte de apariția timusului ca organ limfoid central.

La mamifere, maturarea timocitelor depinde de evitarea a două tipuri de moarte programată: o selecție negativă care constă din eliminarea celulelor al căror TCR reacționează prea eficient cu propriile structuri ale organismului, și o selecție pozitivă prin care sunt eliminate celulele nefuncționale. În cursul selecției negative sunt eliminate celulele care pot recunoaște peptidele autologe prezentate în asociere cu MHC autolog, moartea celulei fiind indusă de complexul MHC + peptide exprimată pe celula prezentatoare de antigen (macrofag).

Selecția pozitivă permite dezvoltarea și maturarea limfocitelor purtătoare de receptori pentru antigen care sunt capabile să recunoască peptidele non-proprii în asociere cu moleculele MHC de clasa I sau II, permițându-le maturarea ulterioară.

Susceptibilitatea la aceste două modalități de selecție depinde de exprimarea TCR pe timocite, de fenotipul MHC din mediul timic și de specificitatea receptorilor pentru epitopi proprii sau non-proprii. La șoarece, mor zilnic în timus cca.  $5 \cdot 10^7$  celule, la fiecare 3-4 zile fiind înlocuite toate cu progenitori noi. Majoritatea mor în cortexul timusului, dar se pare că multe mor și după ce au părăsit organul, adică după ce au trecut prin medulară și au ajuns în circulația periferică. La celulele imature *CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>*, primul lanț care se exprimă este polipeptidul  $\alpha$  al TCR, rearanjările locusului  $\alpha$  permițând exprimarea receptorilor  $\alpha\beta$  numai către sfârșitul proliferării intratimice, după care urmează selecția negativă cu blocarea celulelor *CD4<sup>+</sup>* sau *CD8<sup>+</sup>*. Selecția pozitivă ar avea loc ulterior, cu mult după exprimarea TCR, fiind eliminate toate celulele *CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>* rămase impotente reacțional nu numai față de stimulii liganzilor specifici pentru TCR, dar și la diverși agenți farmacologici cum ar fi ionoforii de  $\text{Ca}^{2+}$  sau forbol-esterii. De fapt, timocitele din corticala timusului nu sunt complet lipsite de posibilitățile de reacție la unii stimuli; ele posedă protein-kinaze, ca de pildă protein-kinaza C, și pot exprima *in vitro* receptori pentru IL-2, deși sunt încă defective în transmiterea semnalelor.

Selecția în timus nu implică modificări ale receptorului pentru antigen, ci moartea sau salvarea de la moarte. Asupra destinului acestora exercită o influență hotărâtoare înseși proteinele receptorului pentru antigen, în sensul că celulele care au sintetizat lanțul  $\alpha$  al acestui receptor mor dacă nu-și pot sintetiza și lanțul  $\beta$  pentru a forma heterodimerul  $\alpha\beta$  al receptorului (selecție pozitivă). Inițial, lanțul  $\beta$  al receptorului pentru antigen, asociat complexului *CD3* ar controla expansiunea timocitelor imature și transcrierea lanțului  $\alpha$  pentru ca, ulterior, controlul să fie



exercitat de către heterodimerul complet. În acest stadiu, ar fi eliminate celulele care nu pot recunoaște liganzii de adeziune intercelulară și cele care recunosc peptidele proprii (selecție negativă). Scăpate de aceste selecții, celulele încep să exprime un număr tot mai mare de receptori pe suprafața membranei lor, evoluând spre  $CD4^+$  sau  $CD8^+$ .

Se poate spune deci că, în timus, protimocitele, precursorii cei mai imaturi, se găsesc în zona subcorticală a organului. În zona corticală sunt celulele  $T$  în curs de maturare, iar în medulară, celulele  $T$  competente. Evenimentele proliferative au loc în regiunile exterioare ale organului, pe când rearanjările genelor receptorilor și exprimarea proteinelor controlate de ele au loc în cortex.

Așadar, la nivelul timusului ar fi cca. 2 - 6% celule  $CD4^+CD8^-$  care reprezintă populația precursoră cea mai imatură, 70 - 80% celule  $CD4^+CD8^+$ , dintre care majoritatea vor muri, și 15 - 20% celule  $CD4^+CD8^-$  sau  $CD4^-CD8^+$  prezente în medulară, din care o parte vor muri aici, iar altă parte în periferie, motivele acestei selecții târzii nefiind elucidate până în prezent. Se pare că o linie de celule  $T$  derivate din timus nu respectă "regulile clasice" ale selecției pozitive și negative. Ele nu au heterodimerul  $\alpha\beta$  ci homodimerul  $\alpha\alpha$  și ar recunoaște antigenele proprii, fiind probabil responsabile, în condiții încă neelucidate, de reacții autoimune atunci când scapă de sub controlul celorlalte populații de celule reglatoare.

Se știe că în timus există două tipuri de limfocite care diferă între ele în privința densității, caracterelor antigenice de membrană și orientării spre funcții efectoare. O populație eterogenă ca volum și densitate se află în corticală, iar alta, mai omogenă, în medulară. În comparație cu cele din medulară, celulele din corticală sunt, după cum menționam mai sus, mai imature funcțional, fapt care a condus la ideea că diferențierea precursorilor timocitari spre celulele medulare, funcțional mai active, este consecința unei "bifurcații" care are loc într-un anumit punct al procesului evolutiv, pre- sau intra-timic. Studiile experimentale efectuate pe șoareci au evidențiat faptul că, într-adevăr, la nivelul acestui organ există două tipuri de celule: unul care exprimă slab antigenul Thy-1 și intens antigenele  $H-2$  și altul care exprimă intens Thy-1 și slab  $H-2$ , exprimându-se diferite ipoteze care încearcă să explice procesul de maturare intratimică.

Ceea ce este sigur, este faptul că maturarea precursorilor la nivelul organului limfoid primar nu este absolută, o parte din progenitori ajungând în periferie unde procesul de formare a celulelor imunocompetente continuă. El ar avea loc la nivelul epidermului, care ar fi un organ imunologic comparabil cu timusul și care ar favoriza diferențierea și proliferarea unor populații  $T$  prin intermediul unor citokine secretate local. Aceste populații ar fi atrase aici de către factori locali prin aceleași mecanisme de "homing" ca și cele care realizează homing spre timus, aderarea făcându-se prin  $CD3$  și  $LFA-1$ .

Acest fapt obligă la reticențe și la prudență atunci când se trag concluzii în biologie, deoarece schemele rigide nu sunt cele mai indicate pentru analiza și înțelegerea corectă a fenomenelor. În cazul limfocitelor  $T$ , al celor  $B$  și poate și al altor celule, există fără discuție diferite trepte de evoluție ontogenică, dar fenomenele care au loc la nivelul acestora nu trebuie absolutizate. O celulă precursoră își capătă imunocompetența la nivelul timusului, dar mai poate scăpa de la "școală" cu "lecția neterminată", urmând s-o termine în afara ei.



## IMUNITATEA ANTIVIRALĂ, ANTIBACTERIANĂ ȘI ANTIPARAZITARĂ

Epidemiile, aceste groaznice flagele care au secerat atâtea vieți și au provocat uriașe pagube materiale, au permis o observație empirică importantă atât din punct de vedere practic, cât și teoretic: faptul că supraviețuitorii unui flagel deveneau rezistenți la un nou contact cu agentul etiologic al bolii respective a sugerat ideea că acest agent, pe lângă boală și moarte, poate conferi, în anumite condiții, rezistență organismului. Așa s-a ajuns la introducerea în practică a infecțiilor deliberate, realizate inițial cu germeni virulenți și ulterior cu germeni atenuați sau omorâți (vaccinări), mijloace care au permis stăpânirea bolilor contagioase și chiar eradicarea unora dintre ele, cum este cazul variolei umane considerată eradicată pe globul pământesc din anul 1980.

Succesul programelor de vaccinare nu se limitează numai la aceste aspecte de ordin practic. Ele au generat un domeniu științific nou, imunologia, care, pornind de la studiul mecanismelor care stau la baza apărării antimicrobiene, a ajuns în zilele noastre să-și diversifice atât de mult obiectivele încât, aparent, domeniile ei actuale de preocupări sunt foarte îndepărtate de cele inițiale. Recentele progrese în diferitele domenii ale biologiei celulare și geneticii, cum ar fi hibridoamele celulare, sinteza peptidelor, tehnologiile ADN recombinat etc., progrese care permit o analiză aprofundată a mecanismelor răspunsului imun protector, au scos în evidență existența unor lacune serioase în manipularea antigenelor, estimarea acțiunii protectoare a vaccinurilor sintetice, a mecanismelor care stau la baza reacțiilor de agresiune sau autoagresiune postvaccinală etc. Din această cauză, au revenit în actualitate preocupările care ținesc de elucidarea mai aprofundată a mecanismelor care intervin în apărarea imună față de diverse microorganisme și a modului de influențare a lor.

### CARACTERELE GENERALE ALE VIRUSURILOR ȘI BACTERIILOR PATOGENE SAU SAPROFITE. RELAȚII POSIBILE ALE ACESTORA CU ORGANISMUL GAZDĂ

Dimensiunile submicroscopice sau microscopice ale virusurilor și bacteriilor, dependența lor totală sau parțială de gazdă, care le conferă statutul lor de parazit sau saprofit, viteza rapidă de multiplicare etc. constituie caracteristici generale ale virusurilor și bacteriilor, care le deosebesc de celelalte forme de viață din biosferă.

Dar, pe lângă aceste caractere comune, există și deosebiri fundamentale atât între virusuri și bacterii, cât și între diverse subpopulații ale acestora. Astfel, virusurile, deși sunt de dimensiuni diferite, cu proprietăți antigenice și complexități structurale diferite, sunt în esență organisme inferioare, lipsite de dotarea biochimică necesară realizării proceselor biologice vitale, din care cauză numai parazitismul intracelular obligatoriu le asigură supraviețuirea și multiplicarea. O particulă virală completă este, de fapt, un material genetic format din ADN sau ARN, înconjurat de o peliculă proteică - capsida - care conferă atât protecție acizilor nucleici, cât și posibilități de legare a virionului la receptorul de pe membrana celulei pe care urmează să o infecteze.

Numărul de gene proprii pe care le posedă un virus este extrem de mic - între 3 și 250 - motiv pentru care majoritatea virusurilor sunt nevoite să folosească genomul celulei gazdă. Mai mult, o parte dintre virusuri sunt lipsite de enzimele necesare replicării acizilor nucleici, fapt care le accentuează și mai mult condiția lor de dependență față de celulele procariote și eucariote. Odată ajunși în interiorul celulei, virionii își inseră modesta lor zestre genetică în genomul gazdei care va forma proteinele necesare multiplicării, după care, prin "burjonare" la nivelul membranei sau prin citoliză, părăsesc celula infectată pentru a infecta și invada alte celule sănătoase aflate la distanță sau în imediată vecinătate. Unii virioni rămân cantonați intracelular un timp îndelungat, exprimarea clinică a prezenței lor devenind evidentă doar în situații extreme, care le condiționează multiplicarea și infectivitatea. Alții declanșează necondiționat boala care devine evidentă clinic cu simptomatologia caracteristică agentului viral incriminat. Și într-un caz și în celălalt, virusul perturbă sistemul imun al gazdei, fie prin distrugerea celulelor infectate - efect citopatic - fie prin alterarea funcțiilor lor. Prima situație este o consecință directă a replicării "productive", când virusul se multiplică, inhibă sinteza proteinelor celulei gazdă și alterează integritatea ei structurală. În cea de-a doua situație, virusurile non-citopatice nu afectează integritatea celulară, dar inhibă sau denaturează unele funcții importante ale ei. În cazul în care sunt infectate limfocitele, macrofagele sau alte celule ale sistemului imun (tabelul 106), consecința directă a replicării virale asupra funcțiilor imune este condiționată de populația celulară afectată: apariția bolilor de autoagresiune în cazul infectării limfocitelor  $T$  supresoare ( $T_s$ ), a imunodeficitelor severe atunci când sunt interesate celulele  $T$  ajutătoare ( $T_h$ ), a imposibilității de rejecție a diferiților agresori străini sau a grefelor de tesuturi ca urmare a distrugerii limfocitelor  $T$  citotoxice ( $T_c$ ) etc.

Virusurile non-citopatice alterează eliberarea unor factori solubili cu rol important în reglarea răspunsului imun, cum ar fi limfokinele sau monokinele. Ca urmare a acestor interferențe, prezența virusului, chiar dacă nu duce la distrugerea celulei, generează grave disfuncții ale sistemului imun în totalitatea sa. De exemplu, interleukina-1 (IL-1), secretată de către macrofage, este o monokină care intervine ca al 2-lea semnal inductor al proliferării limfocitelor  $T_h$  stimulate de către antigenul inductor al semnalului 1. În cazul denaturării moleculei sau al alterării sintezei sau secreției IL-1, răspunsul imun nu mai are loc, instalându-se imunosupresia sau toleranța imunologică.



**Virusuri care infectează limfocitele și monocitele  
(după M.B.McChesney și M.B.A.Oldstone)**

Virusul	Gazda	Celule infectate
<i>ADN dublu catenar</i>		
Virusul hepatitei B	- Om, maimuță	- Limfocite T, B
Papovavirusuri	- Om, maimuță	- Limf. sânge periferic
Adenovirusuri grup C	- Om	- Limf. T, B, celule nule
Virusul herpes simplex	- Om	- Limfocite T
Virusul citomegalic	- Om	- Limfocite, monocite
Virusul Epstein-Barr	- Om	- Limfocite B
Virus Pox	- iepure	- Limfocite splenice
<i>ADN monocatenar</i>		
Parvovirusuri	- Porc	- Limfocite splenice
Virusul murin	- Șoarece	- Limfocite
<i>Catenă pozitivă ARN</i>		
Poliovirusuri	- Om	- Limfocite, monocite
Rubeola	- Om	- Limfocite T, B
<i>Catenă negativă ARN</i>		
Virusul rujeolic	- Om	- Limf. T, B, monocite
Virusul sincițial respirator	- Om	- Limfocite, monocite
Virusul stomatitei veziculoase	- Om, șoarece	- Limfocite T
Virusul influenței A	- Om	- Limfocite, monocite
<i>ARN ambisens</i>		
V. coriomeningitei limfocitare	- Șoarece	- Limf. T, B, monocite
<i>Retrovirusuri</i>		
Virusul leucemiei murine	- Șoarece	- Limfocite B
Virusul leucemiei feline	- Pisică	- Limf. T, B, macrofage
HIV	- Om	- Limf. T, monocite

O altă consecință a impactului unor virusuri cu celulele sistemului imun este proliferarea limfocitară necontrolată, care generează un număr mare de limfocite nefuncționale, responsabile în final de "sufocarea" și distrugerea organismului. Este cazul leucemiilor, de genul leucozelor bovine, boli cu profunde implicații de ordin biologic și economic. Și bacteriile, indiferent că sunt patogene sau

condiționat patogene, se deosebesc între ele printr-o multitudine de caractere cum ar fi: forma, dimensiunile celulei, prezența sau absența cililor, capsulei, sporilor, afinitățile tinctoriale, necesitățile metabolice, capacitatea de sinteză sau de secreție a toxinelor etc. Dar, spre deosebire de virusuri, unde există cazuri de tropism în exclusivitate pentru anumite celule ale sistemului imun, cum ar fi HIV sau virusul Epstein-Barr cu tropism pentru limfocitele *T<sub>H</sub>*, respectiv *B* umane etc., nu se cunosc specii de bacterii care să paraziteze în exclusivitate organele sau celulele sistemului imun. Totuși, chiar dacă bacteriile interesează celule, țesuturi sau sisteme care nu intervin în apărarea imună, ele pot influența pozitiv sau negativ funcțiile imune, fie direct, datorită multiplicării masei bacteriene, fie indirect, prin produsele lor de metabolism. De exemplu, stafilococul Cowan are în componența peretelui celular o proteină cunoscută sub denumirea de proteina A stafilococică (SpA), cu afinitate pentru fragmentul *Fc* al moleculei IgG de la majoritatea speciilor de mamifere. Datorită acestui fapt, influența stafilococică poate modifica nivelul seric al imunoglobulinelor fixând citofil la peretele bacteriei (prin *Fc*) moleculele de IgG, fapt care antrenează modificări în eficacitatea funcțională a compartimentului imunității mediate umoral. Alte tulpini de stafilococ secretă SpA care, fixându-se pe *Fc* al moleculelor IgG circulante, vor modifica funcțiile fiziologice ale acestora.

*Vibrio cholerae* secretă o toxină capabilă să stimuleze sinteza adenilat-ciclazei care, la rândul ei, va activa formarea cAMP, un inhibitor al funcțiilor imune mediate celular și în special al celor citotoxice efectuate de către limfocitele *T<sub>C</sub>* și *NK*. Exemple de acest gen sunt numeroase, dar ele nu constituie obiectivul acestui material.

Dintre componentele unor bacterii care prezintă interes din acest punct de vedere, o mențiune specială merită, pentru efectul lor pozitiv asupra reacțiilor imune, lipopolizaharidele (LPS) a căror structură chimică este foarte bine cunoscută (v. fig. 8).

LPS, componente ale membranei exterioare a bacteriilor Gram-negative, posedă un spectru larg de activități biologice, care influențează și modelează funcțiile imune. Dintre aceste activități merită amintite: stimularea secreției de imunoglobuline și a diviziunii celulare, în special a limfocitelor *B* de șoarece pentru care sunt activatori policlonali, activarea funcțiilor fagocitare ale macrofagelor și în special a sintezei și secreției unor monokine implicate în reglarea cooperării celulare, de genul IL-1, activarea unor subpopulații de limfocite *T* etc. Datorită acestor complexe proprietăți biologice, LPS acționează ca adevărate substanțe imunomodulatoare.

## DIFERITE MODALITĂȚI DE APĂRARE ANTIINFECȚIOASĂ A MAMIFERELOR

Modalitățile de apărare antiinfecțioasă a mamiferelor ar putea fi împărțite în două mari categorii: unele care sunt condiționate de relațiile dintre agresori și altele care sunt condiționate de organismul expus agresiunii.

În prima categorie trebuie menționat antagonismul bacterian la baza căruia se găsește competiția pentru factorii nutritivi, producerea de substanțe inhibitoare de genul acizilor grași, colicinelor, diverselor antibiotice etc. Exemplele de antagonism bacterian sunt numeroase. Este cazul relațiilor dintre flora Gram-pozitivă și cea Gram-negativă de la nivelul intestinului. În momentul scăderii, dintr-un motiv



sau altul, a populației lactobacilare Gram-pozitive, proliferază necontrolat și se acumulează în cantități cu mult peste normal germenii și toxinele germenilor Gram-negativi, cu urmări grave pentru organismul gazdă. Când balanța este în favoarea lactobacililor, populația Gram-negativă revine la nivel normal, organismul resimțind pozitiv această echilibrare.

Și la nivelul pielii este o "balanță ecologică" a microorganismelor cu rol important în protecția anti-stafilococică, -streptococică, -fungică etc. Rolul acestei balanțe devine evident după administrarea masivă de antibiotice când, ca urmare a distrugerii bacteriilor, are loc o proliferare necontrolată a fungilor.

În afară de aceste competiții directe interbacteriene, unele specii de germeni sau derivatele lor nu acționează direct asupra altor specii, ci indirect, prin stimularea nespecifică a funcțiilor sistemului imun care, astfel activat, devine mai eficient în combaterea agresiunii, inhibând nespecific multiplicarea agenților infecțioși. Aceste microorganisme sau componente ale lor sunt obiectul unor intense studii imunofarmacologice și biochimice, deoarece există speranța folosirii lor ca instrumente utile de combatere nespecifică a unor boli infecțioase sau neoplazice.

La rândul lor, modalitățile de apărare condiționată de organism pot fi grupate în două categorii distincte, și anume: a) modalități naturale, care asigură protecția nespecifică față de toți agresorii, indiferent de caracteristicile lor și b) mijloace ale imunității dobândite, care asigură protecția nespecifică și care sunt condiționate de caracterul antigenic și de habitatul agentului implicat în agresiune.

În afară de mijloacele naturale nespecifice și de cele dobândite, specifice, există și efectori ai imunității care acționează "selectiv". Acești efectori, pentru a-și exprima funcțiile, nu au nevoie de proliferare specifică a clonelor, instalată consecutiv unui stimul primar sau secundar, dar nici nu distrug orice celulă țintă (tabelul 107). Este cazul celulelor NK, efectoare ale citotoxicității naturale mediată celular, care lizează spontan celulele țintă, fără a fi necesar un contact prealabil cu acestea, dar care "selectează" țintele, distrugând numai pe unele, de preferință pe cele limfoblastice, pentru care au receptori și pe care le recunosc selectiv. De asemenea, interferonii acționează fără specificitate pentru virus, dar cu specificitate de specie.

Tabelul 107

Mijloace nespecifice, selective și specifice de apărare față de virusuri și bacterii

Mod de acțiune	Apărarea se realizează prin:
Nespecific	Bariere organice (piele, mișcarea cililor) Secreții (glande lacrimale, sebacee, sudoripare etc.) Temperatura corporală Alți factori bactericizi (lizozim, complement) Fagocitoză primitivă (PMN etc.) Mijloace oxigen-dependente ( $O_2$ , $^1O_2$ , $HO^*$ , $H_2O_2$ )
Selectiv	Citotoxicitatea naturală mediată celular (NK)
Specific	Mediată umoral (prin anticorpi) Mediată umoral și celular (ADCC) Mediat celular - macrofage activate - limfocite T citotoxice - limfocite Td



Antrenarea unora sau altora dintre mijloacele de apărare ale imunității dobândite este condiționată de caracteristicile agresorului. De exemplu, bacteriile care trăiesc și se multiplică în afara celulelor organismului gazdă sau în interiorul acestuia. Aceste particularități de habitat condiționează la rândul lor natura reacțiilor imune de apărare specifică. Împotriva germenilor cu habitat extracelular sau a exotoxinelor, principalele mijloace specifice de apărare imună sunt cele mediate umoral, reprezentate de către moleculele de imunoglobulină cu funcție de anticorpi, iar împotriva celor adaptate la viața intracelulară sunt cele ale imunității mediate celular, cum ar fi macrofagele, limfocitele citotoxice etc. Desigur, nu există granițe rigide între aceste două modalități de apărare imună, un exemplu în acest sens fiind citotoxicitatea mediată celular anticorp-dependentă (ADCC) în care celula ucigașă K atacă și ucide celulele țintă infectate sau denaturate, numai în condițiile în care pe suprafața lor s-au fixat specific un anumit număr de molecule de anticorpi.

Din cele expuse rezultă că între organismul gazdă și agentul infectant există o gamă largă de influențe, fiecare dintre acești doi parteneri căutând să câștige avantaje față de adversar. În final, în majoritatea cazurilor, organismul, mobilizându-și tot arsenalul mijloacelor sale de apărare, reușește să elimine agresorii microbieni.

Rezistența organismului față de diverși agenți infecțioși poate fi înăscută (naturală, nespecifică), situație în care este efectuată de către diverse mijloace nespecifice de apărare, sau dobândită (imună, specifică), efectuată de către moleculele sau/și celulele sistemului imun care recunosc și elimină specific agentul infecțios.

Imunitatea specifică poate fi dobândită activ, ca urmare a activării și multiplicării efectorilor sistemului imun direct de către antigen, sau pasiv, prin transferul de imunoglobuline sau celulele limfoide de la un organism imunizat la altul neimunizat.

#### MIJLOACELE NATURALE NESPECIFICE DE APĂRARE

Acestea formează "primele linii" de protecție antivirală sau bacteriană. Unele dintre ele intervin în faza inițială a contactului dintre agentul infecțios și organism, opunându-se pătrunderii agentului în intimitatea țesuturilor gazdei, iar altele intervin după ce acesta a traversat barierele cutanate și a pătruns în țesuturi.

**Mijloace de apărare cu rol de blocare a pătrunderii agenților infecțioși în organism.** Dintre cele mai eficiente sunt pielea, mucoasele, mișcările cililor, peristaltismul intestinal, unele reflexe care declanșează tusea, strănutul etc.

Pielea și mucoasele alcătuiesc o barieră mecanică impenetrabilă pentru microorganismele din mediul extern (cu excepția unora dintre ele, cum ar fi de pildă stafilococii care o pot traversa). Grație secrețiilor glandelor sudoripare și sebacee bogate în acizi grași, acizi lactici etc., la nivelul ei se realizează condiții improprii de viață pentru bacterii, sporindu-i în acest fel funcțiile protectoare. Mișcările cililor, peristaltismul intestinal, tusea, strănutul etc. favorizează eliminarea mecanică a germenilor. Tot eliminare mecanică realizează și mucozitățile de pe unele suprafețe care, pe lângă funcția strict fizică, pot în unele cazuri să competiționeze cu receptorii pentru virioni de pe membrana celulelor stratului pavimentos, blocându-le posibilitatea de atașare la celule, condiție primordială pentru realizarea infecției. De altfel, absența receptorilor pentru virus pe membrana celulelor eucariote ale



unor specii de animale reprezintă un caracter genetic important în conferirea rezistenței nespecifice a organismului față de unele microorganisme. De exemplu, absența de receptori pentru virusurile leucozelor aviare conferă rezistență unor rase de păsări, în timp ce alte rase, la care celulele au bine exprimați pe membrană receptori, sunt extrem de susceptibile la această boală. O situație similară condiționează și expresia clinică a bolii lui Marek unde lipsa unor subpopulații de limfocite T, capabile să "găzduiască" virusul, face unele rase de găini indiferente la acest agent.

**Mijloace nespecifice de apărare, care intervin după ce agresorul a traversat barierele mecanice;** pot fi încadrate în două grupe diferite de factori, și anume: 1) factori umorali; 2) factori celulari. Acești factori "cooperează" între ei și se condiționează reciproc, contribuind la realizarea unui microclimat nefavorabil multiplicării sau prezenței agenților infecțioși, realizat prin mecanisme diferite cum ar fi, de pildă, ridicarea temperaturii corporale peste limitele fiziologice ale virusurilor sau bacteriilor patogene, stocarea  $Fe^{2+}$  în celulele și țesuturile organismului, făcându-l în acest mod inaccesibil bacteriilor, care pentru multiplicare au nevoie de cantități mari de ioni de Fe etc.

**Factorii umorali** acționează local sau sistemic (general). Dintre cei cu acțiunea locală, un rol important revine lizozimului (care acționează și ca factor "antipene-trant", găsimu-se în unele secreții care spală mucoasele), prezent în țesuturi, în albușul de ou etc. Lizozimul este o mucopetidază capabilă să provoace liza bacteriilor, cărora le scindează mucopetidele de la nivelul peretelui celular.

În cazul mucoaselor, un factor protector care nu întotdeauna acționează strict specific îl reprezintă și moleculele de IgA secretor, capabile să blocheze unele particule virale înrudite antigenic.

Dacă agresorii au reușit să depășească apărarea locală și să invadeze organismul, atunci intervin prompt mijloacele defensive celulare și umorale cu acțiune nespecifică. Dintre cele umorale, care acționează nespecific și "sistemic", mai importante sunt:

a. Properdina din sânge care, în prezența fracțiunii C3 a complementului și a  $Mg^{2+}$ , dobândește remarcabile proprietăți antiseptice.

b. Enzimele lizozomale (fosfataze acide, B-glicuronidaza, arilsulfataza etc.), eliberate din lizozim sub influența endotoxinelor germenilor Gram-negativi.

c. "Proteinele de fază acută" de genul ceruloplasminei, sintetizate și eliberate în cantități mari, ca urmare a infecțiilor sau leziunilor tisulare provocate de diverși agenți infecțioși. La păsări, de pildă, micoplasmele sau unele enterobacterioze induc eliberarea de ceruloplasmină din țesutul hepatic cu activitate histaminică. Pe de o parte, ceruloplasmina se leagă la peretele bacteriilor bogate în fosforilcolină, formând un complex care poate activa complementul pe cale alternativă și poate liza bacteria, iar pe de altă parte, conferă păsărilor rezistență la efectele endotoxinelor bacteriene, datorită proprietăților sale histaminazice.

d. Sistemul interferon sau interferonii ( $\alpha$  sau leucocitar,  $\beta$  sau fibroblastic și  $\gamma$  sau limfocitar) dețin un rol important în apărarea nespecifică antivirală prin inhibiția replicării intracelulare a acestora. Sinteza lor poate fi generată de infecții virale sau de inductori neviralii de genul acidului poliinozilic-policitidilic (poli I:C). Modul de acțiune al interferonilor (IFN) este complex și încă insuficient cunoscut, ei putând influența atât particula virală aflată intra- sau extracelular, cât și celula țintă. Astfel, ei pot activa funcțiile citotoxice ale celulelor NK care, la rândul lor, vor distruge celulele infectate viral. Se leagă la receptori ganglioizidici de pe celule, declanșând sinteza unor proteine ribozomale de legare, capabile să blocheze translația ARN viral, dar nu și pe cea a ARN celular; inhibă metabolismul celulei infectate și deci



"viața gazdei", influențează conținutul în lipide al membranei celulare și, ca atare, modifică întreaga activitate biologică dependentă de membrană, inclusiv exprimarea receptorilor pentru virus; au activitate antineoplazică etc.

e. Sistemul complement realizează apărarea anti-infecțioasă pe două căi diferite, și anume: prin activarea funcțiilor fagocitare ale macrofagelor și granulocitelor PMN, și prin liza bacteriilor sau a celulelor infectate.

În prima situație, celulele fagocitare activate de către complement devin capabile să rețină și chiar să înglobeze agenții străini de organism atunci când aceștia au format complexe cu anticorpii și cu unele fracțiuni ale complementului și care, la rândul lor s-au fixat la receptorii pentru complement de pe membrana celulei. În cea de a doua situație complementul, activat pe cale clasică de către complexul antigen-anticorp sau pe cale alternativă de către diverși activatori de genul endotoxinelor, LPS etc., devine bacteriolitic sau citolitic.

Lipsa totală sau sărăcia în unele componente ale complementului face ca, la unele specii de animale, activarea pe cale clasică să devină practic imposibilă, rolul primordial revenind activării pe cale alternativă. Este cazul șoarecilor săraci în componenta C5, sau al păsărilor, lipsite de C2 și C4. O bogată activitate complementară, cum este cazul la cobai sau nure, ar fi după unii autori cauza rezistenței acestor specii față de tumori. Într-adevăr, se pare că atât cobaii cât și nurele nu fac tumori spontane.

Sistemul complement odată activat, în afară de stimularea fagocitozei și de citoliză sau bacterioliză, participă și la procesele inflamatorii antibacteriene, stimulând deplasarea granulocitelor PMN, permeabilitatea vasculară etc.

*Efectorii celulari ai apărării naturale nespecifice.* Ca și cei umorali, reprezintă "mecanisme primitive" de apărare formate în timpul evoluției filogenetice și realizate de către celule cu funcții fagocitare sau nefagocitare. Este cazul granulocitelor PMN capabile de fagocitoză activă cu distrugerea integrală a materialului fagocitat datorită bogatului conținut de enzime lizozomale, al macrofagelor care degradează "parțial" și selectiv, reținând doar determinanții antigenici, al bazofilelor și mastocitelor cu rol fagocitar minor sau chiar absent dar eliberatoare active de mediatori implicați în inițierea inflamației și facilitarea migrării PMN către locul inflamației etc.

La mamifere, dar nu și la păsări, granulocitele eozinofile proliferază în infecțiile cu helminți, în unele boli infecțioase, în reacții alergice etc. La păsări, echivalentul PMN de la mamifere este "leucocitul neutrofil", celulă dominantă în reacțiile inflamatorii acute, cu un conținut bogat în fosfatază acidă și  $\beta$ -glicuronidază, dar sărace în fosfatază alcalină și peroxidază. La aceste viețuitoare, principalele celule fagocitare sunt trombocitele, abundente în circulație (aproximativ de trei ori mai numeroase decât toate celulele fagocitare), cu citoplasmă bogată în granule de fosfatază acidă și incluziuni lizozomale, dar lipsite de receptori de membrană pentru fracțiunile complementului.

#### MIJLOACE DOBÂNDITE (IMUNE) DE APĂRARE SPECIFICĂ

Sunt moleculele de imunoglobulină cu funcție de anticorpi și diferitele tipuri de celule efectoare care intervin direct în neutralizarea agresorului. Anticorpii sunt efectorii "imunității mediate umoral", iar diferitele celule ale sistemului imun, cum ar fi limfocitele T citotoxice, celulele NK, K, macrofagele, sunt efectoarele "imunității mediate celular".



**Imunitatea mediată umoral.** Anticorpii, sintetizați de către limfocitele *B* stimulate de antigen și ajutate de celulele prezentatoare de antigen și de limfocitele *T* ajutătoare, apar în secvență cunoscută, primii formați fiind cei din clasa IgM și ulterior cei din clasa IgG, IgA etc. Ei realizează apărarea organismului singuri sau în cooperare cu alți mediatori solubili (complementul, diferite alte citokine) sau efectori celulari (macrofage, PMN etc.) cărora le activează funcțiile fagocitare sau citotoxice, facilitând legarea complexelor antigen-anticorp la receptorii *Fc* sau la receptorii pentru complement de pe membrana acestor celule, sau funcțiile citotoxice mediate celular anticorp-dependente (ADCC). Anticorpii, din clasa IgG în special, participă la protecția embrionilor, fiind transferați pasiv de la mamă la fetus, transplacental în cazul mamiferelor, sau transovular la păsări, la care embrionul primește în exclusivitate anticorpi IgG începând cu ziua a 11-a de viață embrionară, transferul masiv având loc în momentul ecloziunii. Rolul anticorpilor este esențial în protejarea față de unele microorganisme sau molecule străine, cum ar fi toxinele bacteriene, virusurile și bacteriile extracelulare, infecțiile cu micoplasme, chlamidii etc., dar este minor față de altele, cum ar fi virusurile leucozei bovine, al laringotraheitei la păsări, infecțiile cu germeni Gram-negativi etc. Practic, punerea în evidență a contribuției lor la apărarea imună a organismului se realizează fie prin administrarea pasivă de seruri imune (seroterapie), fie prin bursectomie la păsări, vertebrate la care bursa lui Fabricius este organul limfoid central de educare a limfocitelor *B* precursorale ale celulelor secretoare de anticorpi (plasmocite). În cazul în care protecția este conferită exclusiv sau predominant de către anticorpi, după bursectomie se constată o scădere sau chiar anularea rezistenței la boala respectivă. De fapt, prin ablația organelor limfoide centrale - timus sau bursa lui Fabricius - poate fi evidențiată cota de participare a efectorilor umorali sau celulari la apărarea imună. De exemplu, rezistența păsărilor față de boala Newcastle scade de 100 de ori după timectomie și de 1 000 000 de ori după bursectomie, fapt care ilustrează elocvent importanța imunității mediate umoral în această boală.

**Rolul anticorpilor în apărarea imună antivirală.** Virusurile pot fi neutralizate de către anticorpi în două maniere diferite, și anume:

a) prin acțiune directă asupra particulei virale în momentul în care aceasta părăsește celula și ajunge în circulație, deci când virusul este infectant, situație în care sunt foarte eficienți în prevenirea reinfecțiilor;

b) prin acțiunile exercitate asupra celulei infectate viral pe care se fixează specific prin *Fab*, favorizând activarea complementului sau funcțiilor citotoxice ale celulelor *K*, efectoare ale ADCC.

Numai unii determinanți antigenici de pe suprafața particulei virale sunt recunoscuți specific de către anticorpi. De aceea, moleculele de imunoglobulină care recunosc pe cei "esențiali" vor fi mai eficace în inhibiția proliferării și diseminării virale în comparație cu cele care recunosc determinanți neesențiali.

Dar, în anumite situații, anticorpii pot avea și efecte negative. De exemplu, în absența complementului pot "masca" antigenul viral exprimat pe suprafața celulei infectate, blocând în acest fel activitatea distructivă a celulelor efectoare ale citotoxicității naturale mediate celular (*NK*), a limfocitelor *Tc* etc. De asemenea, în concentrații mari inhibă activitatea limfocitelor *K*, efectoare ale ADCC.

**Rolul anticorpilor în infecțiile bacteriene** este condiționat de clasa căreia îi aparțin. Astfel, activitatea bactericidă opsonizantă și aglutinantă revine predominant anticorpilor din clasa IgM, iar cea precipitantă celor din clasa IgG. Ca atare, moleculele IgM aglutinează bacteriile imobilizându-le, activează complementul care va liza peretele bacteriilor, facilitează captarea acestora de către celulele



fagocitare etc. Moleculele IgG difuzează rapid în tot organismul (inclusiv în fetus pe cale transplacentară) și neutralizează toxinele sau corpii bacterieni. Anticorpii IgA secretori, cu o rezistență particulară la acțiunea distructivă a enzimelor, reprezintă o importantă linie de apărare antibacteriană de la nivelul mucoasei intestinale, deși unele tulpini bacteriene pot elibera proteaze capabile să descompună moleculele IgA.

Anticorpii pot funcționa asupra bacteriilor în diferite modalități (fig. 200), dintre care cele mai importante sunt:

a. Imobilizarea germenilor ciliați sau flagelați. Această modalitate de acțiune, realizată în principal de către anticorpii din clasa IgM, dar care poate fi efectuată și de către alte clase de imunoglobuline, se dovedește eficientă în frânarea virulenței unor germeni Gram-negativi ciliați sau flagelați, cum ar fi cei din speciile *Proteus*, *Escherichia coli* etc.

b. Inhibiția aderenței la seroase sau mucoase. Unii germeni, în special cei cu localizare digestivă, aderă inițial la mucoasa intestinului, unde formează microcolonii. Pentru realizarea aderenței, care constituie o condiție esențială pentru invazie, bacteria posedă la nivelul peretelui celular niște componente proteice - adevine - care nu sunt altceva decât niște liganzi prin intermediul cărora celula se atașează la mucoasa intestinală. Anticorpii, în special cei din clasa IgA, blochează adevinele și fac imposibile aderența și accesul bacteriilor la țesuturi, blocând în acest fel posibilitatea lor de invazie.

c. Opsonizarea este un mijloc important de apărare antibacteriană. Se știe că primul moment important în apărarea imună îl constituie fagocitarea agresorului și eliminarea sa concomitent cu prezentarea determinantilor antigenici limfocitelor, în vederea declanșării cascadei de reacții imune specifice. Unele bacterii însă sunt înzestrate cu mijloace care le protejează de acțiunea fagocitară a macrofagelor: este cazul capsulei, al proprietăților hidrofile ale peretelui celular, al polizaharidelor capsulare, al proteinei M (la streptococi), al antigenelor O, al microvililor etc. Toți acești factori inhibă atașarea bacteriei la membrana celulei fagocitare și, în consecință, inhibă fagocitoza. Celulele fagocitare pot totuși depăși aceste impedimente. Receptorii Fc și receptorii pentru fracțiunile C 3 sau C 4 ale complementului pot facilita atașarea bacteriilor la membrana celulei fagocitare. Această atașare se face prin intermediul fragmentului Fc al moleculelor de anticorp care s-au fixat pe bacterie, sau prin fracțiunile C 3 sau C 4 ale complementului legat la complexul anticorp-bacterie. În primul caz, complexul anticorp-bacterie se fixează la receptorul Fc de pe membrana macrofagului, iar în cel de al doilea caz, la receptorul pentru complement de pe suprafața aceleiași celule. Se pare că, în cazul atașării la membrană a complexului bacterie-anticorp-complement la receptorul pentru complement, fagocitoza nu are loc, bacteria fiind doar "reținută" la peretele macrofagului. Opsonizarea poate avea loc și în absența

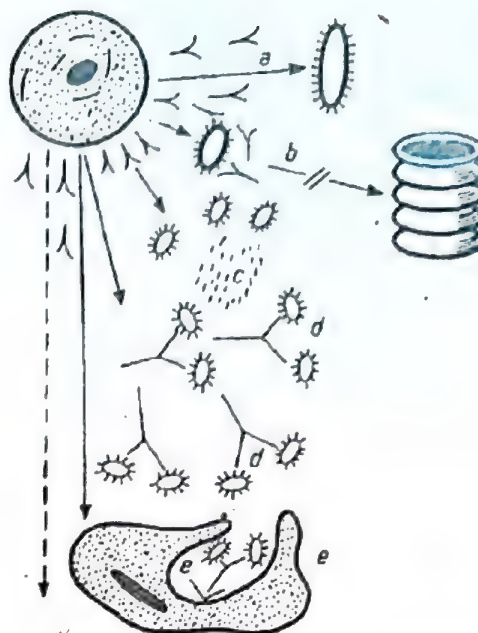


Fig. 200. Modalități diferite de neutralizare a bacteriilor de către anticorpi.

a - imobilizarea germenilor ciliați; b - inhibiția atașării lor la seroase sau mucoase; c - liza bacteriilor dependentă de complement; d - formarea de complexe anticorp-bacterie; e - fagocitoza opsonică a complexelor bacterie-anticorp.



anticorpilor care recunosc specific bacteriile. Aceasta se realizează fie prin activarea complementului pe cale alternativă, fie prin agregate moleculare de imuno-globulină fără funcții specifice pentru determinanții antigenici ai bacteriei respective.

d. Bacterioliza dependentă de complement se instalează numai în condițiile formării complexelor anticorp-bacterie. Susceptibile la liză sunt formele *S* ale germenilor Gram-negativi. Formele *R* sunt mai rezistente, iar germenii Gram-pozitivi sunt practic rezistenți. Mai eficienți în activarea complementului sunt anticorpul IgM, deși această activare poate fi realizată și de către anticorpul IgG, cu condiția ca spațiul dintre două molecule IgG, respectiv dintre fragmentele lor *Fc*, să fie foarte mic. În fazele timpurii ale infecției, anticorpul IgM și eventual și IgA ar juca un rol preventiv important, acționând ca anticorpi naturali capabili să activeze complementul care va liza celula bacteriană.

Cu toate acestea, bacterioliza prin complement nu pare să fie un mijloc important de apărare antibacteriană. Ca dovadă, animalele lipsite de unele fracțiuni ale complementului, sau în cazuri de deficite congenitale care afectează unele sau altele dintre fracțiunile acestui sistem, nu înregistrează o incidență crescută a infecțiilor.

e. Neutralizarea toxinelor bacteriene este realizată aproape exclusiv de către anticorpul din clasa IgG, constituind un mijloc important de apărare cu precădere față de germenii toxigeni.

**Imunitatea mediata celular.** Apărarea imună mediata celular, specifică, efectuată de către limfocitele *Tc* sau de către celulele *K* (efectoare ale ADCC), ori

selectivă, realizată de către celulele *NK* (efectoare ale citotoxicității naturale mediate celular), constituie un arsenal complex și de importanță majoră în protecția față de virusuri (fig. 201).

La diferite specii de animale s-a demonstrat că activarea funcțiilor citotoxice ale acestor celule și în special a limfocitelor *Tc* și a celor *NK* este urmată de instalarea unei rezistențe solide față de infecții. În organismul imunizat sau stimulat nespecific, virusul nu se mai poate multiplica, deoarece celula gazdă este distrusă în cursul replicării virionilor sau în momentul în care determinanții antigenici virali sunt exprimați pe suprafața ei. De exemplu, în boala lui Marek la păsări, suprimarea multiplicării virale și eliminarea celulelor infectate este realizată predominant prin mijloacele imunității mediate celular.

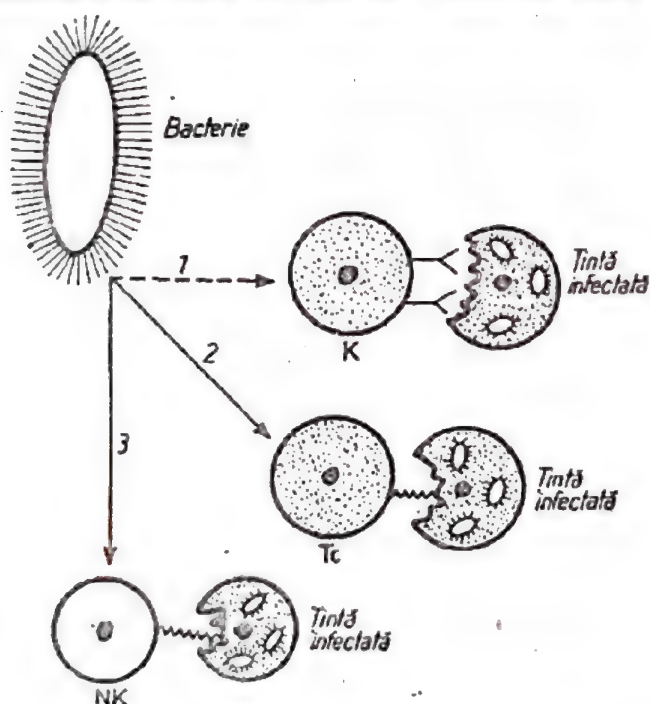


Fig.201. Unele modalități de apărare imună antibacteriană, mediata:

1. Prin citotoxicitate anticorp-dependentă (ADCC);
2. Prin citoliză efectuată de către limfocitele *T* citotoxice (*Tc*);
3. Prin celule *NK*.

De regulă, celulele efectoare ale citotoxicității distrug celulele infectate cu bacterii și nu bacteriile propriu-zise.

Ca și în cazul reacțiilor față de alți agresori, reacțiile imune antivirale se află sub restricția complexului major de histocompatibilitate (MHC), în sensul că limfocitele *T* recunosc numai acele celule infectate viral cu care sunt identice sub raport MHC.

Se pare că susceptibilitatea la infecții virale este asociată cu disfuncții ale limfocitelor *T*, prezența acestor celule fiind necesară atât pentru asigurarea transmiterii mesajelor în vederea sintezei de anticorpi antivirali, cât și pentru realizarea apărării imune mediate celular. De exemplu, virusul cito-megalic este patogen numai pentru șoarecii iradiați letal, la care au fost distruse sau alterate profund limfocitele *T<sub>c</sub>* ( $CD8^+$ ). Șoarecii *Nu/Nu* lipsiți de limfocitele *T* mor în urma infecției cu virusul vaccinal, dar rezistă dacă li se inoculează o limfokină sintetizată de către celulele *T* activate (*IL-2*). De aici concluzia că limfocitele *T* pot acționa direct, ca de altfel și alte celule, asupra celulelor infectate viral pe care le lizează, dar pot acționa și prin eliberarea de citokine care blochează replicarea virionilor. De pildă,  $IFN_\gamma$  este un blocant al replicării virale care, în asociere cu  $IFN_\beta$ , amplifică mult activitatea  $TNF\alpha$  (tabelul 108).

Tabelul 108

Unele modalități de acțiune antivirală a trei citokine

Citokina	Mod de acțiune
<i>IL-2</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Emite semnale chemotactice și activatoare pentru celulele <i>T</i>, <i>NK</i> etc. care vor acționa antiviral</li> <li>- Reglează sinteza de <math>IFN_\gamma</math> de către limfocitele <i>T</i></li> </ul>
$IFN_\gamma$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Poate acționa direct asupra virionilor, inhibându-le replicarea</li> <li>- Induce rezistență față de virus ("stare antivirală") celulelor învecinate cu celula infectată</li> <li>- Acționează antiviral sinergic cu <math>TNF\alpha</math></li> </ul>
$TNF\alpha$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acționează antiviral sinergic cu <math>IFN_\gamma</math></li> <li>- Realizează supresia directă a replicării virale</li> <li>- Activează eliberarea radicalilor liberi de oxigen, care vor "arde" celulele infectate</li> </ul>

Virusul herpetic, inoculat la șoarecii normali, rămâne un timp cantonat la locul de inoculare, după care dispare. Dacă, însă, se instalează deliberat o depresie a funcțiilor imune, virusul difuzează în tot organismul, ca urmare a blocării funcționale a macrofagelor și a celulelor *T<sub>c</sub>*. Oamenii aparent sănătoși sunt purtători ai acestui virus fără a avea manifestări clinice locale sau generale (vezicule, pustule, ulceratii, febră etc.). În caz de stres sau după diferite agresiuni imuno-depresoare, apar leziunile cutanate, uneori pe suprafețe întinse și cu localizări diferite, care pot să dispară și să reapară; alternanța dintre puseele acute și perioadele de remisiune este condiționată de capacitatea de apărare imună mediată celular.

Mecanismele apărării față de bacterii sunt similare celor care intervin în apărarea antivirală, celulele efectoare fiind cele cu funcții fagocitare (monocite, macrofage etc.), citotoxice (*T<sub>c</sub>*, *NK*, *K*), de hipersensibilitate de tip întârziat (*T<sub>d</sub>*) etc. De exemplu, limfocitele *T<sub>c</sub>* ( $CD8^+$ ) au rol major în ce privește asigurarea



rezistenței la infecția cu *Listeria monocytogenes* și formarea granuloamelor, iar cele  $Th$  ( $CD4^+$ ) sunt implicate în dezvoltarea hipersensibilității de tip întârziat. De altfel, limfocitele  $CD8^+$  sunt esențiale în realizarea protecției față de bacteriile cu localizare intracelulară. Dar, uneori, ele pot contribui la diseminarea lor în organism datorită spargerii nișelor celulare în care acestea sunt găzduite. Această diseminare se produce mai ales atunci când titrul anticorpilor din circulație este redus. În asemenea condiții, agenții patogeni nu sunt neutralizați imediat ce au ajuns extracelular, putând pătrunde în alte celule. Acest fenomen se observă și în cazul infecțiilor virale, nu numai în cele cu etiologie bacteriană, constituind încă o dovadă a necesității cooperării tuturor mecanismelor de apărare imună pentru realizarea unei neutralizări prompte și eficiente a agresorilor.

În cazul bacteriilor cu localizare extracelulară, un rol defensiv important revine celulelor fagocitare care, pe lângă fagocitoză (pinocitoză), trebuie să denatureze sau să ucidă rapid materialul înglobat, ucidere care, de regulă, este mai rapidă la bacteriile nepatogene decât la cele patogene. Unele dintre ele, cum ar fi mycobacteriile, chiar dacă sunt fagocitate, nu sunt atacate și descompuse de către enzimele lizozomale ale celulelor fagocitare. Ele inhibă procesul de fuzionare a lizozomilor cu fagozomii, făcând imposibilă intrarea în acțiune a enzimelor bacteriolitice. Altele, cum ar fi *Brucella abortus*, *Mycobacterium avium* etc., sunt rezistente la acțiunea enzimelor lizozomale, putând persista timp îndelungat în fagozomi pe care, în cele din urmă, îi distrug. În astfel de situații, fagocitarea lor prin opsonizare este un mijloc inefficient de apărare deoarece, de regulă, după fagocitare este omorâtă celula fagocitantă și nu bacteria. Dar, prin diverse mecanisme mediate celular, macrofagele sunt activate de unele limfokine, eliberate în special la limfocitele  $T$ , cum ar fi MAF (factorul de activare a macrofagelor), MIF (factorul de inhibiție a migrării macrofagelor), MAgF (factorul de agregare a macrofagelor) etc., limfokine care conferă acestor celule proprietăți citotoxice și bactericide sporite. Limfokinele influențează funcțiile fagocitare și secretorii ale macrofagelor, capacitatea de migrare a lor etc., reținându-le la locul infecției. Aceste macrofage, astfel influențate, capătă o agresivitate antibacteriană crescută și o capacitate sporită de recunoaștere și liză a celulelor propriului organism. La rândul lor, macrofagele au un important rol în declanșarea și controlul reacțiilor celulare care vor activa limfocitele  $B$  în vederea sintezei de anticorpi, în activarea funcțională a limfocitelor  $T_c$ , care vor distruge eficient și specific celulele infectate etc. De asemenea, un rol important în apărarea antibacteriană revine și celulelor  $NK$  și  $K$ .

Rezultă, deci, că sistemul imun dispune de mecanisme și strategii simple, puțin evoluat în cursul filogeniei, și de strategii "s sofisticate", care se opun penetrării și multiplicării agenților infecțioși în organism. Aceste mecanisme și strategii intervin într-un mod condiționat de natura agenților infecțioși implicați - virusuri, bacterii, fungi, paraziți - precum și de localizarea și modul lor de viață parazitară - intracelular, extracelular etc.

Inițial intră în acțiune mijloacele de apărare nespecifică, de pildă barierele cutanate, diferitele molecule aflate în circulație, celulele fagocitare etc., pentru ca ulterior, în cazul în care "prima linie de apărare" a fost străpunsă, să intre în funcție arsenalul mijloacelor specifice, respectiv efectoarele moleculare și celulare (anticorpi, limfocite,  $T_c$  etc.). Barierele cutanate se găsesc în permanență în stare de alertă, din care cauză, de regulă, sunt greu de depășit de către virusuri sau bacterii, cu condiția să fie în perfectă stare de integritate. Orice "soluție de continuitate" provocată în structura lor, ca de pildă secționări, rupturi, arsuri etc., sunt tot atâtea porți larg deschise pentru invazia microbiană. Pielea și mucoasele



normale, fie că este vorba de epiteliul intestinal sau de cel bronșic, sunt în permanență descumate pentru a se elimina bacteriile atașate la suprafața lor. Mișcările peristaltice ale intestinului, cili, secrețiile favorizează această eliminare. Mucozitățile, pe lângă îndepărtarea mecanică a microorganismelor, au și acțiune bactericidă exercitată prin intermediul lizozimului, enzimelor proteolitice, glicolipidelor salivare, sau diferitelor săruri care intră în componența lor. Epiteliile unor organe sunt practic inaccesibile pentru majoritatea microorganismelor: este cazul mucoasei gastrice care, datorită pH-ului foarte scăzut, creează condiții total improprietății dezvoltării florei bacteriene (poate cu excepția speciei *Campylobacter jejuni*).

În ciuda existenței acestor factori de apărare nespecifică, ei pot fi uneori depășiți de agresori, dar în spatele lor se găsește amplasată "a doua linie de apărare": celulele fagocitare și diferitele citokine care preced apărarea specifică formată din celulele prezentatoare de antigen și limfocitele organizate în "aglomerări" celulare mai mult sau mai puțin compacte, asociate zonelor respective, sub formă de celule dispersate în epiteliu, mucoase, plăci Peyer, ganglioni limfatici etc. La aceste nivele au loc recunoașterea specifică a agresorilor, captarea și prelucrarea lor, urmate de instalarea cooperărilor celulare între limfocitele *T* și *B*, proliferarea clonală sau policlonală a acestora, ca de pildă proliferarea limfocitelor în centrul germinativ și foliculari limfoizi etc. De exemplu, limfocitele *B* stimulate antigenic la nivelul intestinului proliferază în foliculii limfoizi, după care migrează în tot organismul sub formă de celule de memorie, realizând generalizarea universală la nivelul organismului a informațiilor privind natura agresorului. La nivelul formațiilor limfoide asociate intestinului, cooperarea se face în interiorul plăcilor Peyer, iar plasmocitele ajunse în centrul germinativ al foliculilor vor sintetiza anticorpi anti-antigene flagelare (*H*) sau somatice (*O*) bacteriene, anticorpi neutralizanți pentru diferite toxine, anticorpi anti-adezine bacteriene etc. Celulele care migrează traversează ganglionii limfatici mezenterici, ajung în ductul toracic limfatic, iar de acolo prin vene și artere se răspândesc în tot organismul, pentru a se localiza în cele din urmă în *lamina propria* sau în alte locuri de elecție, ca de exemplu, mucoasele bronhiilor, ale glandelor salivare, lacrimale etc., unde vor sintetiza IgE. În același timp, circulația vasculară a limfocitelor *B* și *T* sensibilizate la nivelul plăcilor Peyer sau al formațiilor limfoide locale asigură informațional întregul sistem imun.

În *lamina propria* a mucoaselor, moleculele de IgA dimer fixează componenta secretorie produsă de către celulele epiteliale, după care sunt transportate la suprafața mucoaselor sub formă de IgA secretor care, datorită proprietăților lui aglutinante, inhibă absorbția agenților infecțioși pe suprafața epitelială, blocându-le astfel posibilitatea de penetrare. Acest tip de răspuns este activat prin vaccinare orală ca, de pildă, prin vaccinul oral antipoliomielitic care induce o sinteză abundentă de anticorpi IgA secretori.

Dacă, totuși, agresorii au străbătut și această linie de apărare, atunci vor avea de înfruntat atacul specific al anticorpilor, liza dependentă de complement, fagocitoza opsonică, intervenția unor citokine de genul IL-1, IL-6, TNF, care provoacă procese inflamatorii locale și "disconfort" etc. Chiar dacă rămân "ascunși" în interiorul celulelor parazitare, nu pot evita acțiunea citotoxică a celulelor *NK* sau *Tc*. În concluzie, apărarea imună antivirală și antibacteriană se realizează printr-un complex de mijloace înăscute sau dobândite care intră în acțiune în diferite momente ale agresiunii. De regulă, intervenția conjugată a tuturor acestor mijloace sfârșește prin a elimina agresorul și a restitui armonia funcțională a organismului.



Dar, aceste strategii ale mecanismelor de apărare imună antiinfecțioasă au și unele limite care pot fi generate de intervenția unor factori intrinseci sau extrinseci organismului. Din prima categorie trebuie menționată "moștenirea genetică" a acestuia, iar din a doua multitudinea de factori de mediu neinfecțioși ca, de exemplu, iradierile, intoxicațiile cronice sau acute, diferite agresionări stresante, sau agenți infecțioși, cum ar fi virusul imunodeficienței dobândite (HIV), care alterează profund capacitatea de apărare a organismului. Deficitele funcțiilor fagocitare de sinteză a imunoglobulinelor și în special dereglările lor funcționale sunt principalii factori responsabili de instalarea unor infecții cronice virale sau bacteriene. De exemplu, unele persoane contractează infecții stafilococice cronice dispersate sub formă de abcese sau furunculi de diferite dimensiuni pe toată suprafața corpului sau localizate pe anumite regiuni ale acestuia, în special pe față sau pe spate. În ciuda intervențiilor terapeutice locale și generale, care apelează la mijloace complexe începând cu antibioticele, și terminând cu vaccinuri, autovaccinuri, anatoxine stafilococice, boala poate evolua cronic ani de zile. Cauza majoră a acestei "impotențe" a apărării imune este, printre altele, dereglarea raportului normal existent în populația limfocitară *T*, manifestată prin creșterea procentului de limfocite *Ts* ( $CD8^+$ ) și activarea funcțională a acestora. La această dereglare se poate asocia și o redusă activitate secretorie a macrofagelor și monocitelor, cu referire specială la sinteza și secreția de IL-1 și eventual de TNF, precum și scăderea potențialului lor fagocitar. Terapia imunomodulatoare cu Cantastim, care readuce funcțiile și rapoartele intercelulare în limite normale, asociată cu stimularea clonală specifică cu autovaccin stafilococic rezolvă problemele într-un timp record.

Deficitele imunității mediate celular pot fi responsabile de infecțiile oportuniste, un exemplu devenit de acum "clasic" fiind sarcomul Kaposi în infecțiile cu HIV. În unele situații, răspunsul imun este responsabil de instalarea unor stări patologice, cum este cazul complexelor imune circulante care pot genera stări de hipersensibilitate, sau al unor anticorpi care pot provoca leziuni organice autoimune, de genul endocarditelor, consecutiv infecțiilor stafilococice. Dar, acestea sunt excepții care este de dorit să fie cât mai rare.

În concluzie, apărarea imună antivirală și antibacteriană se realizează printr-un complex de mijloace înnăscute sau dobândite, care intră în acțiune în diferite momente ale agresiei. De regulă, intervenția conjugată a tuturor acestor mijloace sfârșește prin a elimina agresorul și a restabili armonia funcțională (homeostazia) a organismului.

## APĂRAREA IMUNĂ ÎN INFECȚIILE PARAZITARE

Mamiferele pot fi infectate cu diverse protozoare, trematode, nematode etc., care cantonează în diferite organe și țesuturi și a căror prezență, în general, nu este incompatibilă cu viața gazdei, dar creează teren favorabil pentru infecțiile virale și bacteriene. Paraziții, atât în stadiul de dezvoltare larvară cât și în stadiul adult, pot infecta o specie unică sau diverse animale aparținând unor specii diferite. Prezența lor poate altera profund unele funcții biologice sau poate produce doar un simplu disconfort la locul de cantonare. De regulă, au un ciclu de viață complicat și un număr mare de determinanți antigenici (epitopi) care pot fi exprimați doar într-un anumit stadiu de dezvoltare și pe care-i pot modula foarte rapid, eliberându-i în cantități foarte mari în mediul înconjurător, de unde ajung în circulație.



răspândindu-se în tot organismul. Antigenele parazitare pot circula ca atare, stimulând reacțiile imune mediate umoral sau celular, sau sub formă de complexe antigen-anticorp.

Deci, organismul gazdă, chiar dacă aparent tolerează paraziții, nu este total areactiv față de ei: îi recunoaște ca străini dar nu-i poate îndepărta așa cum face cu grefele de țesuturi sau organe. Explicarea acestui fenomen particular de "toleranță" aparentă încă nu a fost dată în mod satisfăcător. Este foarte posibil ca relațiile dintre organismul invadat și parazitul invadator, datorită "vechimii" lor în evoluția filogenetică, să fi stabilit un "modus vivendi" care permite o conviețuire în care eficiența mijloacelor de rejecție este extrem de limitată.

#### MECANISME PRIN CARE PARAZIȚII EVITĂ REACȚIILE DE APĂRARE ALE GAZDEI

În vederea perpetuării proprii lor specii, paraziții evită atacurile gazdei recurând la diverse mijloace de "fofilare", cum ar fi:

a. Alegerea locului optim de cantonare în organism. Unii paraziți s-au adaptat vieții intracelulare devenind inaccesibili mijloacelor de apărare mediate umoral (tabelul 109). Alții, cum ar fi *Trichinella*, cisticercii, se înconjoară de structuri protectoare de genul unor capsule fibroase, membrane chistice etc. prin intermediul cărora se izolează aproape perfect de intervenția distructivă a acestor mijloace. Alții se izolează "funcțional", dispunând în acest scop de posibilități eficiente de blocare a enzimelor lizozomale, a aminelor vasoactive, radicalilor de oxigen de genul  $O_2^-$ ,  $^1O_2$ ,  $HO^*$ ,  $H_2O_2$  etc.

Tabelul 109

Exemple de căi de "evadare" a paraziților de sub controlul imun al gazdei  
(după I.M. Roitt și colab.)

Parazit	Habitat	Mijloace folosite de către organism pentru apărare	Mijloace de evitare a efectului distructiv al acestor mijloace
<i>Trypanosoma</i>	Torentul circulator	Liză prin anticorpi și complement	Modulația antigenică
<i>Plasmodium</i>	Hematii	Anticorpi	Modulația antigenică Localizare intracelulară
<i>Toxoplasma</i>	Macrofage	Enzime lizozomale Metaboliți	Inhibă fuziunea lizozomilor Anulează metaboliții $O_2$
<i>Trichinella spiralis</i>	Mușchi, intestin, sânge	Eozinofile Anticorpi + complement	Prin închistare
<i>Schistosoma mansoni</i>	Intestin, sânge, plămâni	Eozinofile Anticorpi + complement	"Împrumută" antigenele gazdei Este mascată de către complexe antigen + anticorp



b. Modulația antigenică permite evitarea acțiunii anticorpilor sintetizați de către gazdă prin variații continue ale determinantilor antigenici de suprafață, paraziții prezentând la diferite intervale de timp o altă haină care, până să fie recunoscută ca "străină" de către sistemul imun, este înlocuită de către alta.

c. "Camuflarea" cu ajutorul antigenelor specifice gazdei. Unii paraziți, cum ar fi *Schistosoma mansoni*, încorporează selectiv pe suprafața lor glicolipide cu specificitate antigenică proprie grupelor sangvine ale gazdei, prin intermediul cărora se "camuflează" perfect de mijloacele de apărare ale acesteia.

d. Inhibiția funcțiilor de apărare a organismului. Numeroși paraziți eliberează factori limfocitotoxici solubili, care inhibă reacțiile imune. Imunosupresia indusă de către diverși factori eliberați activ de către paraziți, de larvele lor sau de către cantitatea masivă de antigene parazitare este nespecifică, ea afectând atât imunitatea celulară cât și pe cea mediată umoral. Dar, infecția parazitara poate induce și o supresie specifică prin activarea limfocitelor *T* supresoare (*Ts*) care vor inhiba, printre altele, reacțiile de hipersensibilitate de tip întârziat, sinteza de anticorpi, proliferarea policlonală a limfocitelor etc. În unele situații, această supresie specifică este totuși salutară atât pentru parazit cât și pentru gazdă, care nu mai este expusă acțiunii unor mecanisme violente de apărare de genul celor de hipersensibilitate de tip imediat sau întârziat, care i-ar perturba nespecific unele funcții biologice importante.

Bineînțeles că și în infecțiile parazitare intervin mijloace de apărare nespecifice sau specifice, ultimele fiind expresia unor cooperări celulare și a unor mecanisme de reglare în mare parte încă insuficient cunoscute.

#### MECANISME DE APĂRARE ANTIPARAZITARĂ FOLOSITE DE CĂTRE ORGANISMUL INFECTAT

În relația gazdă-parazit intervin procese complexe finalizate fie prin stabilirea unui echilibru, fie prin modificarea homeostaziei organismului cu alterarea gravă a funcțiilor sale fiziologice. În mare măsură, orientarea acestor procese spre o direcție sau alta este influențată de către sistemul imun, care în condiții normale poate limita sau chiar anula invazia bacteriană ori, în caz de depresii, poate favoriza extinderea acesteia. Astfel, infecțiile parazitare care la animalele normale evoluează benign și asimptomatic, la cele imunodepresate, consecutiv gestației, carențelor alimentare, timentomiei neonatale, tratamentelor cu ser antilimfocitar sau cu diverse citostatice, iradierilor letale etc., evoluează exploziv, interesând chiar și organe care de regulă nu sunt infectate de către parazitul respectiv ("sindrom de hiperinfecție"). În această ordine de idei, merită menționată infecția umană cu *Pneumocystis carinii* care, la pacienții imunodepresati, cum ar fi sindromul de imunodeficiență (AIDS) generat de către virusul HIV, are o evoluție dramatică și contribuie în mare măsură la grăbirea sfârșitului letal.

Toate acestea constituie dovada indiscutabilă a rolului care revine mijloacelor de apărare în instalarea și evoluția infecțiilor parazitare.

Dar, mecanismele de apărare, inclusiv cele imune, variază considerabil de la un parazit la altul, sau chiar de la o specie la alta, astfel că înțelegerea, stăpânirea și dirijarea lor rămân încă un deziderat. Cu toate că studiul infecțiilor parazitare și al biologiei paraziților a început cu mult înaintea studiului bacteriilor sau virusurilor, totuși, imunoparazitologia este și în prezent slab dezvoltată. Dintre motivele principale care au condiționat această "întârziere" ar putea fi amintite următoarele:



- a. dificultatea de cultivare *in vitro* a paraziților și deci de obținere de antigene parazitare la un înalt grad de puritate și suficiente cantitativ.
- b. Complexitatea ciclului de viață al paraziților, cu faze diferite de dezvoltare, caracterizate prin exprimarea de determinanți antigenici diferiți.
- c. Modulația antigenică a paraziților.
- d. Insuficiența cunoaștere a caracterelor lor genetice.
- e. Complexitatea și particularitățile formelor de apărare imună care intervin în infecțiile parazitare.

În comparație cu reacțiile de apărare antivirală sau bacteriană, cele anti-parazitare au unele caracteristici distincte. Astfel, apărarea antiparazitară mobilizează un număr mai mare de mecanisme specifice sau nespecifice, mediate umoral sau celular, care controlează nu numai multiplicarea agenților infectanți la locul de cantonare, dar și diseminarea lor în organism. De exemplu, se pare că în malarie complicațiile clinice ar fi datorate unor toxine, așa că imunitatea în această parazitoză ar fi în parte antiparazitară și în parte antitoxică. Febra și alte semne ale bolii ar fi datorate unor "autotoxine" eliberate ca răspuns la "autotoxigeni" derivați din paraziți. Încercările de vaccinare au folosit antigene recombinat destinate prevenirii primului stadiu al infecției sau un amestec de peptide obținut din stadiile asexuate din sânge. În serul pacienților cu malarie se găsesc antigene termostabile eliberate de schizozomi după faza exoeritocitară, care de fapt sunt niște "toxine" care ar putea constitui materialul de bază al viitoarelor antigene.

Pe lângă mijloacele "clasice", în care intervin diferite celule efectoare, în acest gen de agresiune sunt masiv interesate granulocitele eozinofile, mastocitele, limfocitele *T* de hipersensibilitate de tip întârziat (*Td*) etc. Multe infecții sunt asociate cu splenomegalii pronunțate, fapt care sugerează că antigenele parazitare acționează ca activatori policlonali pentru limfocite. Unii paraziți stimulează sinteza unor anumite clase de imunoglobuline. Astfel, unele protozoare care parazitează elementele figurate ale sângelui stimulează sinteza anticorpilor din clasa IgM, altele, a celor din clasa IgG, iar paraziții intestinali, sinteza moleculelor IgE.

### Mecanisme nespecifice de apărare în parazitoze

În prezent, este evident faptul că susceptibilitatea sau rezistența gazdei față de parazit este sub controlul unor anumite gene care, probabil, că la speciile parazitare sunt recesive. O dovadă că este așa o constituie modul de dezvoltare a unui parazit în gazde aparținând unor specii rezistente. De exemplu, teniile pot infecta și alte gazde, dar în afara celor specifice lor nu-și mai pot completa ciclul de viață. Ele sunt eliminate de către gazda "adoptivă" a cărei rezistență ar fi controlată de gene dominante care, la speciile susceptibile la infecții, ar fi recesive.

Este foarte greu de precizat în ce măsură controlul genetic interesează mecanismele nespecifice și specifice de apărare. Astfel, recent, a fost lansată o ipoteză interesantă privind implicațiile mecanismelor genetice în apărarea antiparazitară (fig. 202), care se bazează pe observații asupra modului de comportare a unor tulpini de șoareci la infectarea experimentală cu unii paraziți.

Șoarecii pot fi infectați cu nematode, cum ar fi viermii din speciile *Trichinella spiralis* și *Nematospiroides dubius*, a căror formă adultă colonizează intestinul subțire. În mod normal, pe suprafața celulelor antigen prezentatoare (APC) de șoarece sunt exprimate moleculele din clasa a II-a a complexului major de histocompatibilitate (MHC), a căror sinteză este controlată de către genele sub-regiunilor I-A și I-E ale MHC. Cu alte cuvinte, celulele APC sunt I-A<sup>+</sup> și I-E<sup>+</sup>. Animalele aparținând haplotipurilor s, b, q, f sunt I-A<sup>+</sup> și I-E<sup>+</sup>, produsele genelor I-E nefiind exprimate pe membrană.



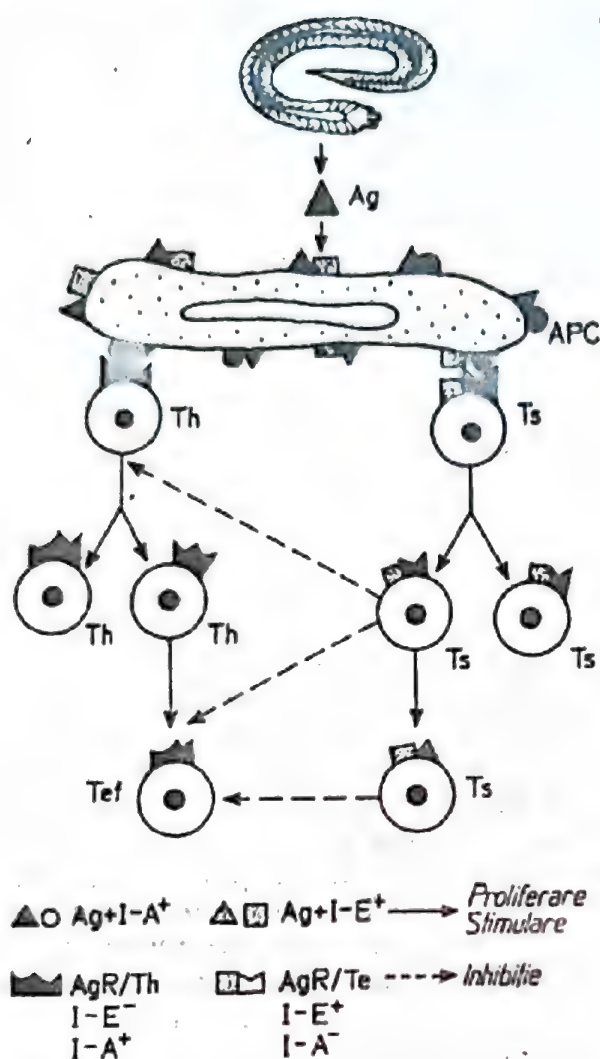


Fig.202. Controlul genetic în apărarea anti-parazitară.

Antigenele parazitare (Ag) sunt exprimate pe membrana celulelor prezentatoare de antigen (APC) în asociere cu moleculele MHC de clasa II (I-A sau I-E la șoarece). Animalele, la care pe membrana celulelor APC sunt exprimate predominant moleculele I-A, vor reacționa față de antigenele parazitare, deoarece în această situație sunt stimulate limfocitele Th, la care receptorul pentru antigen este asociat cu I-A-. La animalele la care sunt exprimate predominant moleculele I-E, va fi stimulată proliferarea limfocitelor Ts, care vor supresa atât proliferarea Th cât și cooperarea acestora cu T efectoare (Tef). La adăpostul acestei supresii este favorizată multiplicarea paraziților (după D.L.Wassom și col.).

Experimental s-a constatat că șoarecii care exprimă mai multe molecule I-E sunt mai susceptibili la infecțiile cu acești paraziți în comparație cu cei I-A<sup>+</sup> - I-E<sup>-</sup> deci cu haplotipurile s, b, q și f, deoarece antigenele prezentate de către APC limfocitelor T în asociere cu moleculele I-E nu numai că nu stimulează proliferarea, dar chiar inhibă semnalele transmise pe I-A. Probabil că asemenea determinisme genetice sunt prezente la diverse niveluri ale mijloacelor de apărare. Ca și în infecțiile virale sau microbiene, un rol important revine barierelor tisulare, mișcărilor peristaltice ale intestinului, secrețiilor diverse, pH-ului etc. De asemenea, funcțiile fagocitare ale macrofagelor, granulocitelor, activitatea citotoxică a celulelor NK, intervenția factorilor solubili din ser de genul complementului etc. reprezintă tot atâtea mijloace de apărare nespecifică antiparazitară.

### Mijloace imunospecifice de apărare antiparazitară

În principal nu se deosebesc de cele care intervin în apărarea antivirală sau bacteriană, cu excepția faptului că, pe lângă mijloacele mediate umoral sau celular cunoscute, o contribuție majoră au unele clase de imunoglobuline, cum ar fi IgE, și unii efectori celulari de genul eozinofilelor, mastocitelor, bazofilelor etc.

a. *Efectori ai imunității mediate umoral.* În diferite infecții parazitare se înregistrează o sinteză activă de anticorpi cu specificitate față de diverși determinanți antigenici ai parazitului infectant. Aceștia au o mare importanță în infecțiile



parazitare cu localizare extracelulară, în prevenirea reinvaziei, atunci când paraziții se află în afara celulei, dar își pierd posibilitatea de intervenție atunci când aceștia pătrund în celulă fără exprimarea la suprafața ei de determinanți antigenici sau fără alterarea membranei celulare. Anticorpul pot acționa împreună cu sistemul complement direct asupra paraziților, provocând alterări ireversibile la nivelul acestora, pot bloca atașarea lor la celulele sau țesuturile pe care le infectează cu predilecție, pot activa funcțiile fagocitare, ale macrofagelor sau neutrofilelor, intervin în uciderea paraziților prin mecanisme anticorp-dependente, mediate celular, efectuate de către celulele K, monocite etc. Diferitele tipuri de celule efectoare, în asociație cu diferite clase de imunoglobuline, acționează selectiv față de paraziți. Astfel, eozinofilele sunt celule careucid eficace larvele de *Trichinella spiralis*, macrofagele distrug filariile etc. Sinteza activă de IgE în infecțiile cu unele nematode contribuie la activarea și sensibilizarea mastocitelor și bazofilelor care, la rândul lor, eliberează amine vasoactive capabile să provoace perturbări atât parazitului cât și locului de cantonare a acestuia, făcând imposibilă prezența în continuare a agentului infectant.

Dar, antigenele parazitare pot acționa și ca activatori policlonali, activând nespecific proliferarea celulelor B și sinteza imunoglobulinelor fără specificitate de anticorpi. Așa s-ar explica hipergammaglobulinemia nespecifică, frecvent întâlnită în infecțiile cu localizare extracelulară sau intracelulară.

Prezența anticorpilor circulanți cu specificitate față de paraziți poate fi pusă în evidență prin reacții de aglutinare, precipitare, de liză a paraziților sau celulelor parazitare, prin imunofluorescență indirectă, reacții de fixare a complementului, de imobilizare a paraziților, de neutralizare, opsonizare etc.

Totuși, anticorpul au un rol minor în apărarea antiparazitară. De exemplu, la păsări, s-a demonstrat existența de anticorpi față de coccidii, cum ar fi *Eimeria maxima*, *E. acervulina*, *E. tenella* etc., capabili să ofere un oarecare grad de protecție a animalelor expuse la infecții orale. La nivelul bilei și serozităților intestinale a fost pusă în evidență existența de anticorpi din clasa IgA cu rol protector. Cu toate acestea, atât prin transfer pasiv de anticorpi cât și prin bursectomie, s-a demonstrat că, deși anticorpul au o oarecare contribuție la protejarea animalelor față de coccidii, totuși, această protecție este de mică importanță, rolul major revenind mijloacelor de apărare mediate celular și în special limfocitelor T citotoxice.

**b. Efectori ai imunității mediate celular.** Șoarecii normali infectați cu *Trypanosoma cruzi* fac o boală ușoară care se vindecă în câteva zile (14 - 20 zile) cu expulzarea totală a paraziților. În cazul celor timentomizați neonatal sau al celor cu atimii congenitale (șoareci *Nu/Nu*) infecția cu acest parazit evoluează dramatic, cu sfârșit letal. Aceste date dovedesc rolul major care revine limfocitelor T în protecția față de acești paraziți.

Dar cazul citat mai sus nu este singular. În infecțiile cu *Theileria parvum* care parazitează limfocitele bovinelor, are loc o distrugere "autoimună" a celulelor parazitare efectuată de către limfocitele T<sub>0</sub>, distrugere care reprezintă modalitatea cea mai importantă de apărare imună a organismului față de acest parazit. Limfocitele T<sub>h</sub> (CD4<sup>+</sup>) sunt foarte importante pentru eliminarea paraziților *in vivo*, în special a celor cu localizare la nivel eritocitar. În funcție de profilul citokinelor produse, limfocitele T aparțin, după cum se știe, la două subgrupe funcționale: a) T<sub>h1</sub> implicate în imunitatea mediată celular, sub controlul IFN<sub>γ</sub>, moleculele efectoare fiind TNF, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, oxidul nitric etc., și b) T<sub>h2</sub> responsabile de imunitatea mediată umoral și controlate de IL-4. În infecțiile parazitare aceste două căi imunologice acționează adesea antagonist, o cale putând conferi rezistență



organismului față de paraziți, iar alta, sensibilitate. În general, limfocitele  $T_H1$  sunt eficiente în cazul paraziților cu localizare în citoplasma macrofagelor, ca de pildă *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* etc. În aceste parazitoze,  $T_H2$ , respectiv IL-4, favorizează persistența parazitului dar conferă răspuns protector, prin reacțiile de tip inflamator pe care le provoacă în parazitoze cu localizare extracitoplasmatică de genul infecțiilor cu *Trichinella spiralis*, *Heligmosomoides polygus*, *Nippostrongylus Brasiliensis* etc.

Ciclosporina A, un represor al populației celulare T și un inhibitor al sintezei de IL-3 și GM-CSF favorizează infecția cu *Leishmania major* ca urmare a deprimării potențialului imun de apărare. Existența unor funcții normale ale macrofagelor și limfocitelor T este absolut necesară, în special în fazele timpurii ale acestei infecții, putând s-o blocheze foarte eficient. De asemenea, faptul că vaccinul anti-*Leishmania mexicana*, realizat prin purificarea glicoproteinei gp63 de pe suprafața promastigotelor, este protector datorită activării limfocitelor T, iar celulele devenite rezistente la infecțiile cu *Theileria parva* au bine exprimat pe membrana lor receptorul pentru IL-2 constituie dovezi categorice în favoarea rolului jucat de această clasă de limfocite în apărarea antiparazitară. În unele parazitoze, cum ar fi cele provocate de către oxiuri, trypanosome etc., limfocitele T eliberează limfokine care activează macrofagele, în sensul că acestea exprimă mai intens receptori pentru Fc sau pentru C3 prin intermediul cărora fagocitează și rețin mai intens paraziții. Totodată, ca urmare a acestei activări, eliberează cantități mari de radicali de oxigen de genul superoxid-anionului ( $O_2^-$ ), oxigenului "unic" sau "singlet oxygen" ( $^1O_2$ ), radicalului hidroxil ( $OH^\cdot$ ), peroxidului de hidrogen ( $H_2O_2$ ) etc., prin intermediul cărora distrug paraziții sau celulele infectate de către aceștia.

În cazul în care paraziții nu mai pot fi eliminați, macrofagele și limfocitele T eliberează factori fibrogenici locali, care stimulează formarea de granuloame cu încapsularea și izolarea parazitului. Tot limfocitele T sunt responsabile de secreția și antrenarea eozinofilelor în infecțiile cu viermi intestinali. În acest scop, se eliberează un factor specific, promotor al stimulării eozinofilelor (ESP = Eosinophil Stimulated Promotor) care antrenează și stimulează proliferarea acestor celule (fig. 203).

Eozinofilele acționează pe două planuri distincte, și anume: a) în asociație cu anticorpii, ca celule efectoare ale citotoxicității mediate celular anticorp-dependente (ADCC) și b) prin eliberarea de enzime consecutiv degranulării lor, enzime care, împreună cu cele eliberate de către mastocite, vor controla permeabilitatea vaselor, provocând inflamații la locul de cantonare a parazitului și, ca atare, condiții de "disconfort" pentru acesta.

Macrofagele și limfocitele T activate pot produce  $TNF\alpha$ ,  $TNF\beta$ ,  $IFN\gamma$  etc. În malarie, unde agentul etiologic este *Plasmodium falciparum*, sunt paroxisme febrile și uneori severe complicații cerebrale. Simptomatologia clinică în această boală se pare că este expresia stimulării de către produsele de origine parazitară, în timpul ruperii eritrocitului, a monocitelor și limfocitelor T. Acestea vor elibera în cantități mari TNF și  $IFN\gamma$  care vor declanșa paroxisme febrile și simptomatologia cerebrală. Deci, TNF, poate reproduce fidel simptomatologia malariei. Produsele de degradare a parazitului stimulează în mod diferit limfocitele  $T\alpha\beta$  și  $T\gamma\delta$ . Aceste două populații celulare, deși se deosebesc între ele în ce privește restricția MHC, se aseamănă prin efectul lor citotoxic și capacitatea de a secreta IL-2,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  și  $TNF\beta$ .

În afară de limfokinele care activează macrofagele, eozinofilele, mastocitele etc., limfocitele T eliberează și factori nespecfici care acționează asupra epiteliului intestinal, stimulând secreția și mișcările peristaltice, mișcări care vor contribui la eliminarea parazitului.



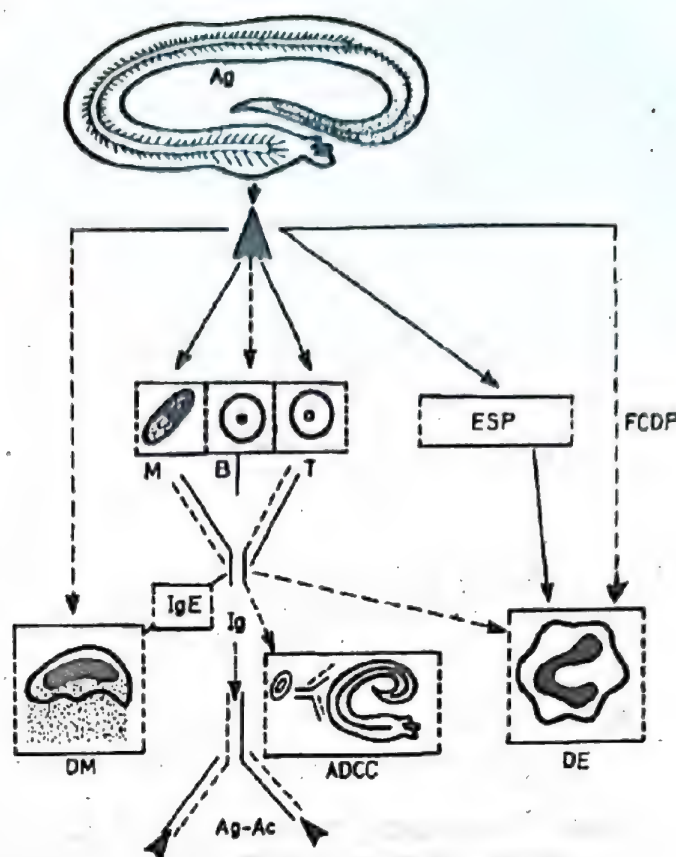


Fig.203. Diferitele modalități de reacții imune antiparazitare.

Antigenele parazitare (Ag) stimulează macrofagele (M), limfocitele B (B) și T (T). Limfocitele B stimulate sintetizează anticorpi (ig) care vor neutraliza paraziții prin reacții imune mediate celular (ADCC), prin fixarea antigenelor parazitare circulante (Ag-Ac), prin degranularea mastocitelor (DM) sau a eozinofilelor (DE). Aceste degranulări sunt realizate de anticorpi din clasa IgE. Totodată este stimulată sinteza de "factori promotori ai eozinofiliei" (ESP) și de "factori chemotactici, derivați din paraziți" (FCDP) care activează eozinofilele, atrăgându-le la locul de cantonare a paraziților (după I. Roitt și col.).

Desigur, în infecțiile parazitare ca de altfel și în agresiuni de alt gen, cum ar fi cele provocate de către virusuri și bacterii, nu sunt implicate doar unul sau altul dintre mijloacele de apărare imună. De regulă, cooperează un mare număr de astfel de mijloace care pot sau nu pot duce la neutralizarea și eliminarea agresorului.

În concluzie, se poate afirma că prezența paraziților antrenează un complex de mijloace nespecifice sau specifice de apărare, în cadrul cărora se instalează cooperări celulare și sunt antrenate mecanisme de reglare a lor. Cele mai proeminente dintre acestea ar fi supresiile specifice, care inhibă activarea policlonală a limfocitelor și proliferarea lor. Dar, în absența factorilor carențiali sau a stresului provocat de către diferite cauze, această inhibiție se reflectă și asupra celulelor T supresoare, care nu vor mai prolifera și nu vor mai fi active funcțional, ajungându-se la depresia întregului mecanism cu revenirea la normal a funcțiilor imune, exceptând pe cele care vizează specific parazitul infectant.



## IMUNITATEA ANTITUMORALĂ

### IPOTEZE PRIVIND APARIȚIA TUMORILOR

Boala canceroasă, generată de către modificarea și multiplicarea anarhică a celulelor diferitelor țesuturi și organe, multiplicare asociată cu pierderea funcțiilor normale ale acestora, este cunoscută de multă vreme. Dar, atât timp cât omenirea a trăit sub amenințarea permanentă a bolilor cu etiologie virală și bacteriană, dintre care unele se răspândeau în adevărate "valuri epidemice" devastatoare, atenția acordată bolilor maligne, datorită nedifuzibilității acestora, era situată pe plan secundar.

Vaccinurile și serurile terapeutice, care au permis stăpânirea și controlul eficient al bolilor contagioase și chiar eradicarea unora dintre ele (variola), au creat condițiile evaluării mai corecte a gravității tumorilor maligne, nu numai pentru individ dar și pentru societate, ravagiile produse de cancer devenind evidente și din ce în ce mai alarmante.

Cercetările fundamentale în domeniul imunologiei tumorale au început la sfârșitul secolului XIX și continuă și în prezent. Pentru a descifra și a explica modul de apariție a cancerului, au fost emise diferite ipoteze, ca de pildă ipoteza "embrionară", "iritativă", "virală" etc.

Prima susținea că celula care este capabilă să se înmulțească activ și anarhic provine dintr-o celulă tânără, nediferențiată, care este de fapt o celulă embrionară cantonată în țesuturile organismului unde a rămas încă din stadiul de dezvoltare embrionară a acestuia și care, la un moment dat, începe să se multiplice devenind nocivă pentru organism. Într-adevăr, între celulele tinere ale embrionului și cele cu caracter neoplazic apărute la adult există foarte multe asemănări: și unele și altele au un potențial proliferativ mare, exprimă slab unele antigene, dar au alți determinanți antigenici comuni, cum ar fi antigenul carcinoembrionar (CEA) sau alfa-fetoproteina (AFP), care nu sunt exprimate deloc sau sunt exprimate foarte slab pe celulele normale.

Ipoteza iritativă susține că iritarea permanentă a unui țesut poate duce la malignizarea lui. Experimental s-a reușit provocarea de cancere cutanate prin iritarea repetată a pielii cu gudroane. Cancerul buzelor și cancerul bronho-pulmonar, atât de frecvent la fumători, susține această ipoteză. Substanțele chimice cu efect carcinogen ar produce mutații și deviații spre proliferare neoplazică. Dar, s-a constatat că potențialul carcinogen al unor produse chimice variază condiționat de specie sau tulpina de animale testată. Pe de altă parte, unele substanțe necarcinogene pot produce mutații, altele pot fi iritante puternice dar slab mutagene, iar altele sunt slab iritante dar puternic mutagene. Mai mult, unii constituenți naturali ai organismului, ca de pildă hormonii steroizi, când depășesc o anumită concentrație, pot fi carcinogeni. De asemenea, tran-



splântarea experimentală a unor țesuturi endocrine în splina animalelor poate duce la malignizarea lor.

Ipoteza virală este susținută de către o serie de date consistente. Leucemia bovină, leucoza păsărilor sunt boli neoplazice cu etiologie virală certă. Este bine studiată carcinogeneza spontană dată de către virusul MAREK, un virus ADN herpetic, agent cauzal al unei neurolimfomatoze a puilor cunoscută sub denumirea de "boala lui Marek". Leucemia felinei generată de un oncornavirus provoacă o boală similară leucemiei limfoblastice umane.

La om, singurul virus cunoscut până în prezent, care ar putea fi incriminat ca agent etiologic al unei boli neoplazice este virusul EPSTEIN-BARR (EBV) responsabil de limfomul Burkitt frecvent în Africa, de carcinomul nasofaringian, de limfomul imunoblastic consecutiv transplantului renal și, bineînțeles, de mononucleoza infecțioasă virală. În aceste boli, genomul EBV este prezent în materialul nuclear al celulelor maligne, iar în serul pacienților există o cantitate apreciabilă de anticorpi anti-EBV. Aceste date au sugerat rolul EBV în etiologia tumorilor maligne limfoide: el ar stimula răspunsul imun și proliferarea celulelor limfoide, dar diferențierea neoplazică ulterioară a acestora ar fi indusă de către alți factori și nu de către el.

Și virusul hepatitei epidemice B (HBs) a fost incriminat ca agent responsabil de generarea carcinomului hepatic, în celulele care înconjoară procesul neoplazic propriu-zis găsindu-se inserat genomul viral, care însă nu este inserat în celulele tumorale propriu-zise. Existența genomului viral în celulele eukariote, prezența virionilor sau a anticorpilor antiviral sugerează implicația virală în unele boli tumorale, dar semnificația acestei implicații este încă puțin cunoscută. Nu se știe dacă nu cumva prezența virusului nu este efectul unor modificări produse la nivelul celulei de către alți factori, încă necunoscuți, care au favorizat penetrarea virală și proliferarea neoplazică, în acest proces virusul fiind un simplu "musafir inocenț". Poate așa s-ar explica de ce cercetările numeroase și aprofundate, care încearcă să stabilească etiologia virală a diferitelor tipuri de tumori la om, au dat până în prezent rezultate negative.

Așadar, nici una dintre ipotezele amintite nu este universal valabilă, din care cauză, recent, se acordă o mare atenție unor posibile relații care ar exista între unele gene "oncogene" și procesul tumoral. Cercetările fundamentale privitoare la baza moleculară a oncogenezei au semnalat existența unor gene, denumite "oncogene", capabile să provoace *in vitro* transformarea neoplazică a celulelor normale. Aceste oncogene se găsesc în genomul retrovirusurilor și ar fi responsabile de transformarea neoplazică a celulelor eukariote ca rezultat al infectării acestora cu virusurile oncogene. Dar, s-a constatat că și celulele animale normale conțin secvențe de gene omoloage oncogenelor, numite "proto-oncogene". Proto-oncogenele nu provoacă transformări neoplazice, ele codificând pentru diferite proteine implicate în reglarea multiplicării normale a celulelor, ca de pildă unii factori de creștere, receptori de membrană pentru astfel de factori, proteine care transduc semnalele exogene către nucleu, proteine care reglează transcrierea acestor semnale la nivelul nucleului etc. Funcția de control al proto-oncogenelor și produselor lor poate fi însă alterată prin mutații, translocări, rearanjări genice defectuoase etc., toate acestea ducând la pierderea funcțiilor normale ale celulei. Deci, proto-oncogenele nu sunt gene "nocive", ele având funcții normale de codificare a unor molecule implicate în procesele fundamentale ale vieții celulei și care în esență sunt creșterea, proliferarea și diferențierea ei.

Proto-oncogenele celulelor eukariote au fost încadrate în două grupe distincte:

a. Proto-oncogene provenite din oncogenele retrovirusurilor ca urmare a inserării lor în genomul celulelor infectate. Este cazul *ab1*, *erbB*, *fos*, *jun*, *myc*, *myb*, *Ha-ras*, *sis*, *src* etc.



b. Proto-oncogene care nu au corespondent retroviral, cum ar fi *bc1*, *bcr*, *met*, *int1*, *N-myc*, *N-ras* etc. Aceste două grupe de gene codifică pentru sinteza unor proteine cu activitate kinazică, capabile de fosforilarea altor proteine (*erbB*, *src*, *c-kit*, *raf* etc.), pentru unele proteine cu funcții la nivelul nucleului (*fos*, *myc*, *jun*, *myb* etc.) sau pentru proteine care participă probabil la transmiterea de semnale extracelulare cum ar fi p21 codificată de protooncogenele *ras* (tabelul 110).

Tabelul 110

Diferite clase de proteine codificate de proto-oncogene.  
Localizare și funcții  
(după D. Morello și Ch. Babinet)

Activitate	Proto-oncogenă	Omolog cu	Dimensiuni	Localizare	Funcție
Tirozin-kinazică	c-erbB	Receptorul pentru EGF	170 K	Pe membrana plasmatică a multor celule	Leagă EGF
	c-fms	Receptor pentru CSF-1	140 K	Pe membrana macrofagelor și celulelor extraembrionare	Leagă CSF-1
GTP-ază	c-ki-ras 2 c-Ha-ras-1 N-ras	—	21 K	La numeroase celule, pe latura citoplasmatică a membranei	Leagă GTP-aza la GTP și GDP
Proteine nucleare	c-fos	—	55 K	Puternic exprimate în nucleul celulelor hematopoietice, macrofagelor etc.	Leagă indirect ADN
	c-jun	AP-1	62 - 64 K	•	•
	c-myc N-myc L-myc	—	62 - 64 K	•	•
Diversă	c-erb-A	Receptorii pentru hormonii tiroidieni	?	Citoplasmică și nucleară	Leagă tiroxina
	c-sis	Lanțul $\beta$ al PDGF	?	Proteină secretată	Leagă receptorul la PDGF

CSF= factorul de stimulare a coloniilor; EGF= factorul de creștere a epidermului; GTP, GDP= guânidin tri- și difosfat; PDGF= factorul de creștere derivat din trombocite.

În anul 1983 s-a demonstrat pentru prima dată că o genă oncogenă poate codifica pentru sinteza unor molecule implicate în controlul creșterii celulei. Este cazul oncogenului *V-sis* al virusului sarcomatos al maimuțelor (SSV), care poate

produce cancerul la aceste animale și care codifică o proteină omoloagă structural și funcțional cu produsul proto-oncogenei *c-sis*, produs care nu este altceva decât lanțul  $\beta$  al factorului de creștere derivat din trombocite (PDGF).

*In vivo*, SSV transformă neoplazic celulele care au receptori pentru PDGF, inducând un semnal permanent de stimulare a creșterii.

Oncogenele pot codifica pentru receptori factorilor de creștere, primul studiat din acest punct de vedere fiind oncogenul *V-erbB* al virusului eritroblastozei aviare. Acest retrovirus are gena *V-erbB* care transformă selectiv celulele liniei eritroide provocând creșterea necontrolată a eritroblaștilor. Aceștia pot deveni eritrocite mature și în absența eritropoietinei, deoarece proteina *GP74<sup>N-erbB</sup>*, un produs al oncogenei *V-erbB*, este o formă modificată a receptorului pentru EGF și are activitate tirozin-kinazică putându-se autofosforila. Și alte gene implicate în procesele de transformare tumorală s-au dovedit a codifica pentru proteinele transmembranare, bogate în cisteină și cu activitate tirozinkinazică, capabile potențial de fixarea unor factori de creștere. Ele pot participa la procesele normale de dezvoltare celulară datorită implicațiilor lor în procesele de proliferare și diferențiere ale acesteia.

Dar, dacă funcția unor oncogene este bine cunoscută, activitatea și rolul lor biologic mai necesită elucidări. O genă, care codifică pentru un factor de creștere, pentru unii receptori ai unor factori de creștere, sau pentru unele proteine implicate în mecanismele de reglare a transmiterii la nivel citoplasmatic sau al transcrierii la nivel nuclear a mesajelor, poate suferi modificări și influențe care să-i devieze funcțiile. La baza acestor devieri ar sta unele intervenții virale, retrovirusurile oncogene înglobând în genomul celulelor eukariote infectate, material genetic oncogen care va conferi celulei gazdă o capacitate de proliferare anormală.

Din păcate, cu toate eforturile depuse, conceptul influenței genetice în declanșarea bolii neoplazice este departe de a elucidă multe aspecte teoretice. Celula transformată de către oncogene este o realitate, sau oncogenele sunt mai bine exprimate în celule transformate din alte cauze? Celula transformată neoplazic își modifică antigenicitatea? Apar antigene specifice tumorii? Pot fi recunoscute aceste antigene de către sistemul imun al gazdei? Tumora este cauza sau efectul unor disfuncții ale sistemului imun?

## ANTIGENE TUMORALE

Existența unor relații între dezvoltarea tumorii maligne și potențialul de apărare al organismului a fost intuită încă din secolul XVIII, dar abia în secolul nostru a putut fi pusă în evidență existența unor reacții imune antitumorale prin folosirea în acest scop a unor tumori induse experimental și a liniilor singenice și transgenice de animale de laborator. A fost chiar imaginată o posibilitate de manipulare a răspunsului imun în combaterea tumorilor prin folosirea unor "gloanțe magice" formate din anticorpi care să poarte diferiți agenți toxici pentru celule și care ar fi capabili să distrugă selectiv tumora fără a leza țesuturile normale.

Unul dintre primele argumente în favoarea existenței unui răspuns imun antitumoral a fost dat de cercetarea histologică a tumorilor. Tumorile solide sunt mai mult sau mai puțin infiltrate cu celule fagocitare și cu limfocite, infiltrație care, în multe cazuri, ca de pildă în cancerul de sân, în carcinoamele medulare etc., este un indicator de prognoză pozitivă. Această infiltrație denotă că țesutul tumoral este recunoscut ca non-propriu și atacat de către celulele efectoare ale sistemului



imun. Într-adevăr, tumorile induse experimental la animalele de laborator sunt foarte imunogene, fiind rejectate chiar și atunci când sunt transplantate la animale singene. Limfocitele *T* ale animalelor care au rejectat tumora asigură protecție antitumorală specifică gazdelor în care au fost transferate, fapt care constituie o dovadă certă a intervenției mecanismelor imune de apărare, în care nu anticorpii ci limfocitele *T* au un rol protector major. Dar, spre deosebire de tumorile induse experimental cu ajutorul unor substanțe mutagene, cele apărute spontan nu se dovedesc a fi tot atât de imunogene, neînregistrându-se represiile lor spontane sau imunizarea specifică, deși tumora are un număr mare de epitopi. De exemplu, animalele imunizate cu tumori apărute spontan, a căror multiplicare a fost blocată prin iradiere cu raze X sau tratate cu mytomicină, nu au fost protejate atunci când au primit un nou inocul cu celule neiradiate X, dezvoltând tumori cu aceeași virulență ca și martorii neimunizați.

La om, neoplasmele apar spontan și, ca și în cazul tumorilor spontane ale animalelor, nu regresează, iar imunizarea pacientului cu propria tumoră inactivată este practic imposibilă. Cu toate acestea, sunt cazuri în care îndepărtarea tumorii, fără a avea pretenții că s-a realizat eliminarea totală a ei, duce la vindecare. În mod cert, după extirparea chirurgicală, au mai rămas celule tumorale care ar fi putut regenera tumora primară sau genera metastaze, dar așa ceva nu se mai observă chiar după decenii de la operație, pacientul vindecându-se.

*S-a pus și se mai pune încă problema existenței unor antigene specifice tumorii.* S-a susținut că transformarea malignă poate fi asociată unor modificări fenotipice caracterizate printre altele de pierderea unor antigene proprii celulei normale și câștigarea altora, specifice celulei transformate malign. Aceste neoantigene nu ar fi detectabile la nivelul țesuturilor normale, fiind recunoscute ca aloantigene și neutralizate rapid de către sistemul imun al gazdei. Alte afirmații pledează pentru lipsa totală de antigene particulare pe suprafața tumorii, sprijinindu-și afirmațiile pe lipsa de rejecție a tumorilor spontane și pe acceptarea unor celule tumorale transplantate experimental de către toate animalele aparținând unei specii, indiferent de caracterul lor genetic, cum este cazul tumorilor Ehrlich și Krebs, tumori care sunt acceptate de șoarecii cu cele mai diverse haplotipuri.

Un concept intermediar celor două extreme susține că antigenele tumorale sunt slab exprimate, sunt foarte eterogene, modulează rapid, din care cauză recunoașterea și eliminarea lor este dificilă. Este adevărat că o tumoră este extrem de eterogenă atât din punct de vedere al antigenicității sale, cât și din punct de vedere al potențialului de creștere sau de metastazare, fiind alcătuită din diferite clone de celule, derivate din mutanta inițială, și care sunt expresia labilității genetice a acesteia.

Conform conceptului actual, antigenele tumorale ar putea fi încadrate în patru categorii diferite:

a. Antigene specifice unui anumit tip de tumoră, care nu sunt prezente pe suprafața celulelor normale sau pe alte celule tumorale (TSTA = antigene de transplantare specifice tumorii sau "tumor specific transplantation antigens"). Ar fi cazul unor produse ale unor oncogene activate prin mutații ( $p21^{ras}$ ,  $p210$ ) a carcinoamelor cervicale asociate cu virusul papilomatozei umane etc.

b. Antigene specifice unei anumite tumori care însă se găsesc slab exprimate și pe unele celule normale (TSA = antigene specifice tumorale sau "tumor specific antigens"). Este cazul antigenului TLA de la șoarece, prezent atât pe limfocitele *T* normale cât și pe cele leucemice.



c. Antigene cu specificitate largă, prezente pe diferite tipuri de tumori (TATA = antigene tumorale asociate antigenelor de transplantare sau "tumor associated transplantation antigens").

d. Antigene "oncofetale" care în mod normal sunt exprimate pe țesuturile embrionare, dintre care cele mai bine cunoscute sunt alfa-fetoproteina (AFP) prezentă în unele stadii fiziologice de dezvoltare a organismului și în special în stadiul embrionar, în unele lichide fiziologice cum ar fi lichidul amniotic precum și în diferite stări patologice (hepatomul malign, teratocarcinoame, degenerescențe hepatice etc.). Tot în această grupă poate fi încadrat antigenul carcinoembrionar (CEA), o glicoproteină eterogenă prezentă la nivelul colonului fetal, iar la adult în caz de carcinom al colonului.

La om, evidențierea antigenelor specific tumorale este mai dificilă, deoarece nu pot fi puse în evidență prin aplicarea unor metode experimentale cum ar fi transplantările practicate experimental. Nu a fost posibilă nici decelarea unor reacții *in vitro* din partea celulelor bolnavului cultivate în prezența antigenelor tumorii proprii și nici reacții alogene între limfocitele unui subiect sănătos cultivate în prezența unor celule tumorale provenite de la un alt pacient, din cauza antigenelor HLA diferite ale celor doi donatori. Totuși, într-un studiu efectuat pe 12 000 pacienți cu cancer, au fost identificate complexe imune circulante, niște agregate formate din anticorpi și probabil din antigenele tumorale solubile, complexe care la pacienții aflați într-un stadiu avansat de boală se găseau în concentrație mare, iar la cei cu remisiune, practic dispăreau pentru ca să reapară o dată cu refacerea tumorii. Deși natura acestor complexe antigen-anticorp este încă puțin cunoscută, totuși aceste date sugerează existența unor antigene tumorale capabile să inducă sinteza unor anticorpi și să reacționeze specific cu aceștia. De altfel, recent, au putut fi puse în evidență antigene tumorale proprii unor tumori umane cum ar fi melanomul, cancerule intestinale, leucemiile.

Antigenele TSTA nu stimulează sinteza anticorpilor ci proliferarea clonală a limfocitelor *T* citotoxice, așa că încercarea de evidențiere a lor prin mijloace serologice poate da rezultate fals negative. De altfel, nu este obligatoriu ca antigenele tumorale să fie exprimate numai pe suprafața membranei plasmatică a celulei, ele putând fi localizate și la alte nivele.

De exemplu, recent s-a constatat că celulele tumorale de șoarece pot genera *in vitro* variante foarte imunogene care însă nu pot prolifera neoplazic și care sunt rejectate de șoarecii singenici. Aceste variante, denumite *tum*<sup>-</sup> ("tumor negative") derivate din celule originale care pot forma tumori (*tum*<sup>+</sup>), exprimă antigene noi de transplantare, care lipsesc la celulele originale. Ca și antigenele TSTA, antigenele *tum*<sup>-</sup> prezintă o mare variabilitate, stimulează proliferarea clonală a limfocitelor *Tc* dar nu și sinteza de anticorpi, neputând fi izolate prin imunoprecipitare. S-a reușit identificarea a trei gene care codifică pentru trei antigene *tum*<sup>-</sup>, constatându-se că structura lor este total diferită de cea a genelor care codifică pentru imunoglobuline sau pentru moleculele complexului major de histocompatibilitate. De asemenea, organizarea lor diferă de cea a altor gene cunoscute până în prezent, diferind între ele prin mutații punctiforme existente la nivelul unui singur exon, care generează modificarea pozițională a unui singur aminoacid în lanțul polipeptidic a cărei sinteză este controlată de către gena respectivă. Aceste mutații ar fi responsabile de exprimarea și diversitatea antigenelor *tum*<sup>-</sup>.

S-a constatat că două gene *tum*<sup>-</sup> codifică pentru proteine lipsite de extremitatea NH<sub>2</sub> terminală tipică. Se pare deci că mutațiile în genomul celulelor eukariote pot genera formarea unor peptide antigenice care nu stimulează sinteza de anticorpi, dar care pot fi recunoscute de către limfocitele *T*.





Fig. 204 A. Șoareci cu tumora ascitogenă Ehrlich (x) și șoareci normali (xx).



Fig. 204 B. Șoareci inoculați s.c. cu  $1 \cdot 10^6$  celule Ehrlich dezvoltă o tumoră solidă (săgețile).

formație solidă, neletală, care este rejectată.

Într-o serie de experimente noi am încercat să verificăm dacă într-adevăr tumora ascitogenă Ehrlich este lipsită de imunogenitate. În acest scop șoarecii au fost inoculați pe cale subcutanată cu  $1 \cdot 10^6$  celule tumorale suspensionate în 0,5 ml de mediu de cultură IC<sub>65</sub>. Cei care au rejectat tumora solidă formată după acest inocul au primit intraperitoneal același număr de celule. Animalele astfel tratate nu au mai dezvoltat ascita, inoculul subcutanat dovedindu-se a fi imunizant. De aici concluzia că și tumora ascitogenă Ehrlich posedă determinanți antigenici, fiind deci imunogenă.

Dar, rezultatele obținute au generat unele întrebări: a) există un singur determinant sau mai mulți determinanți antigenici?; b) aceștia sunt exprimați numai la suprafața membranei plasmatică sau și în straturile mai profunde ale ei?; c) de ce aceeași tumoră este letală și neimunogenă atunci când este inoculată intraperitoneal și este neletală dar imunogenă atunci când este inoculată subcutanat?

Tratând menajant celulele Ehrlich cu pronază (50  $\mu$ g pronază pentru  $1 \cdot 10^6$  celule), o enzimă care desface legăturile dintre aminoacizii lanțului polipeptidic până la nivelul inserțiilor hidraților de carbon, am constatat că animalele imunizate prin inocul subcutanat cu celule netratate enzimatic nu dezvoltă ascita dacă primesc intraperitoneal celule normale sau celule tratate cu pronază. Dacă, însă,

Dar, și în cazul tumorilor considerate "universale" pentru că ar fi lipsite de determinanți antigenici, problema este discutabilă. După cum menționam anterior, tumora ascitogenă Ehrlich este considerată universală deoarece nu este rejectată dacă este inoculată intraperitoneal la șoarece, unde formează o ascită în cavitatea abdominală urmată de moartea animalului (fig. 204). Indiferent de tulpina de șoareci, inoculul intraperitoneal al unui număr mic de celule Ehrlich este letal, după 10 - 14 zile, în lichidul de ascită găsindu-se un număr foarte mare de celule tumorale. Lipsa aparentă a oricăror reacții de apărare din partea gazdei a fost explicată ca fiind consecința unei lipse a stimulilor antigenici generați de către această tumoră. Totuși, încă de prin anii 60 s-a semnalat faptul că eliminarea ascitei poate duce la vindecarea animalului. Mai mult, acesta devine imun, nemaidezvoltând tumora ascitogenă după o nouă inoculare de celule. Dacă însă celulele tumorale sunt inoculate pe cale subcutanată, la locul de inoculare se dezvoltă o



stimulul antigenic subcutanat se face cu celule tratate enzimatic, atunci protecția se realizează numai în cazul inoculului intraperitoneal cu astfel de celule, dar nu și cu cele normale, netratate cu pronază. De aici concluzia că tumora ascitogenă Ehrlich are determinanți antigenici proprii, aceștia au cel puțin două specificități diferite, iar aceste specificități se găsesc la diferite nivele ale membranei plasmatice.

Inexistența unor reacții imune din partea gazdei și letalitatea provocată de tumoră atunci când este inoculată intraperitoneal ar fi consecința sintezei și secreției, de către ea, a unor produse care inițial îi "maschează" determinanții antigenici și care sunt puternic inhibitori ai funcțiilor imune mediate celular. Pentru a permite mijloacelor imune de apărare a gazdei recunoașterea și eliminarea ei, este necesară realizarea unui contact rapid între aceasta și celulele sistemului imun, situație realizabilă pe cale subcutanată, dar nu și intraperitoneală, unde celula Ehrlich poate să elibereze unii factori care o "camuflează" și care supresează funcțiile imune ale gazdei. Ipoteza, poate simplistă, a putut fi parțial confirmată experimental: inocularea subcutanată a celulelor tumorale suspenzionate în lichid de ascită facilitează dezvoltarea tumorii solide care, deși poate ajunge la dimensiuni uriașe, nu imunizează animalul.

Cele expuse mai sus ilustrează gradul de incertitudine și confuzie care există în prezent în problema antigenicității tumorii. Se pare că țesutul neoplazic ar avea determinanți antigenici proprii, dar exprimarea acestora și mai ales recunoașterea lor de către efectorii sistemului imun al gazdei sunt condiționate de către o serie de factori încă necunoscuți. În mod cert, în momentul de față nu se cunosc încă multe elemente care intervin în relația gazdă-tumoră și poate chiar modul nostru de gândire este încă prea "tradițional", fapt care ne face să abordăm această problemă complexă într-o manieră "clasică", valabilă pentru relațiile organism-alogrefă de țesut normal, dar poate nu și pentru alt tip de agresiune. Poate că proliferarea neoplazică este un proces biologic apropiat de cele normale, dar care are unele particularități pe care încă nu le înțelegem și, ca atare, nu le putem influența și stăpâni.

## MECANISME ȘI MIJLOACE DE APĂRARE ANTITUMORALĂ

A fost semnalată existența mai multor mijloace de care dispune organismul pentru neutralizarea oncogenezei și prevenirea ei. Dintre acestea, ar fi limfocitele *T* citotoxice (*Tc*), macrofagele cu funcții citotoxice specifice și nespecifice, celulele *NK*, diferite tipuri de celule efectoare ale citotoxicității mediate celular anticorpendependente (ADCC), anticorpii, unele limfokine etc.

Existența limfocitelor *Tc* cu funcții antitumorale a fost dovedită în sarcomul MOLONEY și în limfomul BURKITT, ambele induse probabil viral. Sarcomul MOLONEY este foarte imunogen și poate regresa spontan, înainte de începutul regresiei și în timpul ei, tumora fiind infiltrată cu limfocite *Tc* care se dovedesc citotoxic specifice *in vitro* și care dezvoltă răspuns imun secundar atunci când animalul care a rejectat sarcomul este reinoculat cu el. În cca. 38% dintre tumorile spontane la om, s-a constatat infiltrația lor cu limfocite, dintre care 18-87% aparțineau populației de celule *T* și numai 1% populației *B*. Din totalul celulelor *T* doar 26% s-au dovedit a fi citotoxice *in vitro* față de tumora autologă și numai la un raport mare (50:1) de celule efectoare *T* /celule țintă tumorale. Aceste date sugerează că numai o proporție mică de limfocite *T* din populație care infiltrează



tumora sunt celule cu funcție citotoxică specifică. De aici și speculația că limfocitele  $T_c$  ar fi eficiente în regresia tumorilor induse viral, care sunt puternic imunogene, dar ar juca un rol modest în cele apărute spontan, care sunt slab imunogene și care sunt atacate în special de macrofage, celulele  $NK$  și poate și de alte celule, ca de pildă cele cu funcții efectoare ADCC.

Și în sângele periferic al pacienților au fost găsite limfocite  $T$  cu funcție citotoxică față de tumora autologă. Pentru analiza sistematică a lor, au fost necesare izolarea clonelor citotoxice și multiplicarea lor *in vitro*. Această metodă a permis identificarea unor clone de celule  $T$  reactive față de unele tumori, ca de exemplu față de melanomul uman, unde s-au găsit patru clone de celule specializate în recunoașterea a cel puțin patru antigene diferite. Multiplicarea lor *in vitro*, în special a celor care infiltrează tumora, în prezența de IL-2 și apoi reinocularea lui au avut efect benefic la 25 - 40% dintre pacienții care au beneficiat de un astfel de tratament.

Investigațiile privind relația limfocit  $T$ -tumoră se adresează aproape în exclusivitate celulelor  $T_c$ , încercându-se evaluarea lor funcțională. Dar nu este exclus ca și alte subpopulații de limfocite  $T$ , care nu au funcții citotoxice, să dețină unele atribute funcționale în apărarea antitumorală. Ele ar putea participa indirect la liza celulei tumorale prin eliberarea de limfokine, având astfel un rol reglator asupra altor efectori ai imunității.

Datele obținute până în prezent demonstrează că un răspuns imun antitumoral eficient necesită următoarele condiții: a) prezența determinantilor antigenici la nivelul celulelor neoplazice; b) exprimarea acestora pe suprafața celulei; c) legarea lor la moleculele MHC; d) limfocitele efectoare să poată avea acces la celula tumorală; e) antigenele exprimate să stimuleze atât limfocitele  $T_c$  cât și pe cele  $T_h$ .

Bineînțeles că, pentru declanșarea răspunsului imun în cazul în care condițiile menționate sunt asigurate, este necesară realizarea unui contact intim între celulele efectoare și celula tumorală.

Aderarea între aceste celule este activ reglată de către o serie de evenimente chimice care au loc în cursul activării celulare și în care, în afară de integrine și selectine, sunt antrenate și moleculele accesorii ale limfocitelor  $T$ ,  $CD4$  și  $CD8$ , cu dublu rol funcțional: de aderare propriu-zisă și de asociere intimă cu complexul receptorului pentru antigen și tirozinkinaza  $p56^{lck}$  de pe  $T$ . Nu este exclus ca unii factori produși de către celula tumorală să blocheze aderarea celulelor efectoare, anulând efectul stimulant al antigenelor ei.

În afară de limfocitul  $T$ , considerat a fi efectorul esențial al răspunsului imun antitumoral, multe funcții de apărare revin altor celule. Astfel, macrofagele, în special cele activate, pot avea activitate tumoricidă sau reglatoare a reacțiilor de apărare. Cele tumoricide pot distruge celula tumorală chiar atunci când se află într-un raport mic cu acesta (1:1). Ele pot realiza protecția atât față de tumora indusă experimental, cât și față de tumora spontană.

În afară de efectul citotoxic direct, macrofagele pot inhiba proliferarea tumorală prin efectul lor citostatic sau prin funcțiile lor secretorii care le permit sinteza și eliberarea unor produse nocive, cum ar fi-factorul de necroză a tumorilor (TNF), sau a unor monokine cu rol major în declanșarea și stimularea funcțiilor imune ale limfocitelor, cum este cazul IL-1. Ca și în cazul limfocitelor  $T$ , efectul macrofagelor asupra tumorilor este extrem de complicat și puțin înțeles. Ele pot bloca tumora, o pot ucide, dar pot secreta și factori de creștere care stimulează proliferarea



celulelor tumorale, angiogeneza și deci irigarea tumorii. Prin unele monokine, pot supresa unele funcții ale limfocitelor. Se pare că, chiar funcția citotoxică a lor este dependentă și influențată de o serie de factori încă necunoscuți. Unele studii experimentale semnalează faptul că tumorile transplantate sau induse nu sunt rejectate de către animalele de experiență care sunt lipsite de macrofage cu funcție citotoxică. Alte studii însă constată că macrofage citotoxice există atât la șoarecii care pot elimina tumora cât și la cei la care aceasta se dezvoltă nestânjenit. Aceste constatări pun sub semnul întrebării rolul funcției citotoxice a macrofagelor în apărarea antitumorală.

Alți efectori ai imunității antitumorale sunt limfocitele *NK*, o populație de celule considerată ca făcând parte din "prima linie de apărare", deoarece pot ucide spontan, nespecific dar selectiv celulele modificate viral sau deviate neoplazic, limfocitele *LAK*, celulele efectoare ale citotoxicității *ADCC*, precum și unele citokine cum ar fi limfotoxinele, *TNF* etc.

## FACTORI CARE POT FAVORIZA DEZVOLTAREA TUMORII

Organismul dispune de atâtea mijloace de apărare antitumorală încât apariția și dezvoltarea acesteia pare un adevărat miracol. Cu toate acestea, celula tumorală reușește să depășească și să înfrângă efectorii imunității, sfârșitul fiind letal pentru gazda în care s-a dezvoltat procesul neoplazic. De fapt, boala neoplazică ar fi benignă dacă tumora nu ar metastaza. Gravitatea ei, bineînțeles cu unele excepții, nu este dată nici de dimensiunea tumorii primare, nici de localizare, ci de difuzibilitatea ei, de capacitatea ei de a se "transplanta" la distanță, de a se "împrăști" în tot organismul, prin contiguitate sau prin vasele sangvine sau limfatice. De aceea, poate calea cea mai rațională de combatere a cancerului ar fi suprimarea potențialului de metastazare a tumorii. Unele tumori sunt mai metastazante decât altele, iar în cadrul aceleiași formații proliferative, unele celule au o abilitate de metastazare mult mai mare decât altele. Pentru diseminare, celula metastazantă trebuie să se desprindă de tumora "mamă", să pătrundă printre alte celule normale, să traverseze peretele vaselor sangvine sau limfatice, să supraviețuiască în torentul circulator, să se atașeze la alte țesuturi și să prolifereze. Pentru realizarea acestor condiții, ea trebuie să nu exprime sau să exprime slab determinanții antigenici, să-i mascheze, să sintetizeze sau să folosească diferite enzime ca de pildă collagenaze, activatori de plasminogen etc., să exprime molecule de adeziune și să evite atacul celulelor ucigașe inhibându-le funcțional. La noul loc de dezvoltare, tumora metastazată este dependentă de angiogeneza, motiv pentru care tumorile solide produc un număr mare de factori angiogenici care vor stimula proliferarea capilarelor nou formate, în vederea realizării rapide a unei rețele dezvoltate de vase necesare pentru aprovizionarea cu oxigen și factori nutritivi. Se pare că angiogeneza însoțește sau chiar precede procesul de malignizare, iar limitarea sau blocarea extinderii vaselor de neoformație ar opri creșterea tumorii. De aceea, moleculele produse de către celulele normale, care pot bloca angiogeneza, ar fi utilizabile potențial în terapia antitumorală (tabelul 111). De asemenea, ele ar putea anula efectul unor molecule secretate de către tumora, care stimulează angiogeneza (tabelul 112).



Inductori și activatori ai neovascularizării in vivo (după N.Bouck)

Grupa de produse (structură chimică, funcții)	Produsul
Factori de creștere sau alți factori	Factorul de creștere a fibroblastelor Factorul de creștere a celulelor epidermale Interleukina - 1 $\alpha$ Factorul de necroză a tumorilor $\alpha$ Factorul de creștere a celulelor endoteliale derivat din trombocite Factorul de permeabilizare a vaselor
Alte proteine	Angiotensina II Angiogenina Activatorul de plasminogen Ceruloplasmina Poliamine
Substanțe neproteice	Nicotinamida Adenozindifosfatul (ADP) Prostaglandinele E <sub>1</sub> și E <sub>2</sub> Heparina Selenium (10 <sup>-7</sup> M) 1- butiril - glicerolul Lactații

În afară de angiogeneză, sunt și alți factori care favorizează metastazarea tumorii și proliferarea ei. Este cazul moleculelor de adeziune care ar favoriza atașarea unor enzime, al diferiților factori care permit mascarea determinantilor antigenici, al modulației antigenice etc. Unele molecule, ca de pildă *sialomucina*, sunt prezente constant pe membrana celulei tumorale, pe de o parte mascându-i determinantii antigenici, iar pe de altă parte deregând posibilitatea de atașare a celulelor citotoxice, până la anularea aderenței lor la țintă.

Tratarea celulelor tumorale cu neuraminidază favorizează formarea de conjugate între acestea și limfocitele T, deoarece această enzimă degradează sialomucinele. Efect "blocaant" asupra antigenicității tumorii au și anticorpii sau complexe antigen-anticorp care ar "masca" epitopii celulelor tumorale, iar prin fragmentul Fc ar bloca receptorii Fc ai celulelor LAK. De asemenea, anticorpii anti-tumoră ar activa "modularea antigenică", stimulând "internalizarea" sau "raderea" antigenelor tumorale de pe suprafața celulei neoplazice, facilitând astfel "fofilarea" și difuzarea în tot organismul a tumorii scăpate, evadate, de sub controlul sistemului imun. Așadar, modificările de la nivelul membranei plasmatică a celulei maligne îi creează un potențial particular de difuzibilitate, supraviețuire și multiplicare. Celulele cu o mare capacitate de metastazare, exprimă gene similare oncogenelor, au pe suprafața lor molecule și structuri cu proprietăți similare receptorilor pentru factori de creștere, pot penetra ușor în vasele sangvine și pot evita atacul celulelor citostatice, scăpând de sub supravegherea imună.

Tabelul 112

Inhibitori ai procesului de neovascularizare *in vivo* (după N.Bouck)

Caractere chimice, funcții	Produsul
Inhibitori enzimatici	Inhibitorii ribonucleazei placentare Inhibitori ai sintezei prostaglandinelor (indometacin, aspirină etc.) Inhibitori ai metaloproteinazelor
Fragmente de proteine	Trombospondina (o glicoproteină de 140 kD) Peptide derivate din laminină
Modulatori ai metabolismului colagenului	Analogi ai prolinei $\alpha, \alpha$ - dipiridil $\beta$ - aminopropionitril
Alți factori	Steroizi angiostatici Protamine Retinoizi Factorul IV trombocitar Metotrexat D - penicilamina

## RELAȚIA TUMORĂ - SISTEM IMUN

Observația, că tumorile care sunt puternic metastazante sunt slab infiltrate cu limfocite, ar sugera că răspunsul imun specific ar avea un rol major în controlul difuzibilității și proliferării lor și, deci, în controlul bolii neoplazice. Deși la om este încă greu de demonstrat existența unui răspuns imun specific antitumoral, totuși, unele observații clinice sugerează că mijloacele de apărare imună ar juca un rol important în controlul proliferării tumorilor *in vivo*. S-a observat, de exemplu, o creștere a metastazării la pacienți cu imunosupresie generală, la cei cu supresie funcțională a limfocitelor *T* sau a celulelor *NK*, în caz de disfuncții ale macrofagelor etc. Toate acestea pledează pentru existența unor componente ale sistemului imun cu rol în controlul procesului neoplazic. Probabil că în reacțiile imune antitumorale, ca de altfel și în cele declanșate de către antigenele microbiene sau alogrefe, celula prezentatoare de antigen exprimă molecule costimulatoare (*B7*) care, împreună cu moleculele *CD28* de pe limfocitele *T* h, contribuie la adeziunea *APC-T* h și la recunoașterea specifică a epitopilor de către *T* h prin receptorii săi pentru antigen. În lipsa *B7* sau *CD28*, se instalează o anergie a celulelor *T* și, deci, toleranța imunologică față de tumoră. Această toleranță ar putea fi favorizată și de o exprimare slabă a antigenelor *MHC* de clasa II sau de imposibilitatea de sinteză a unor citokine care să transmită semnale activatoare către limfocitele *T* citotoxice (*CD8<sup>+</sup>*).

Încă la sfârșitul deceniului șase al acestui secol, când nu se cunoștea existența celulelor *NK*, *LAK*, a limfokinelor, când nu se știa nimic despre rolul *MHC* în rejecția



alogrefelor, a fost formulată o teorie cunoscută sub denumirea de "teoria supravegherii imune", conform căreia sistemul imun al organismului ar recunoaște și elimina celulele transformate neoplazic, eliminare care ar avea loc permanent, deoarece din populația de celule normale ale organismului ar apărea zilnic cca.  $1 \cdot 10^3$  mutante care se diferențiază neoplazic spontan și care au antigene recunoscute ca străine de către organism. Această diferențiere neoplazică are loc la toți indivizii speciei umane, supraviețuind numai cei care pot dezvolta un răspuns imun eficient, adică numai cei la care supravegherea imună funcționează corect. Conform acestui concept, rejecția alogrefelor de țesut normal ar fi de fapt exprimarea unui potențial de supraveghere anti-neoplazică, potențial care s-a dezvoltat în cursul evoluției filogenetice. Altfel spus, la început au apărut mijloacele de supraveghere antineoplazică ce vizau eliminarea elementelor străine de organism generate în interiorul acestuia, adică mutantele neoplazice, ulterior aceste mijloace fiind folosite și pentru eliminarea non-propriului exogen, respectiv a celulelor sau țesuturilor străine de organism, ajunse accidental în intimitatea țesuturilor acestuia.

Validitatea postulatelor acestei teorii este încă discutabilă. Pe baza ei, inițial se afirma că: a) celulele tumorale se formează zilnic în organism datorită mutațiilor; b) mutantele au antigene specifice; c) sunt recunoscute și omorâte de către efectoarele imunității care supraveghează în permanență apariția și evoluția lor; d) diminuarea din diferite cauze a potențialului de supraveghere imună permite apariția bolii neoplazice.

Ulterior, conceptul a suferit unele modificări, în sensul că se afirmă că: a) celulele cu caracter neoplazic apar accidental în organism, cu o frecvență extrem de redusă; b) ele pot avea sau nu pot avea determinanți antigenici proprii; c) rata redusă de devieri neoplazice nu face necesară existența unei supravegheri imune sau intervenția unui sistem natural de rezistență.

Adepții acestui concept își bazează afirmațiile pe faptul că frecvența apariției tumorilor spontane nu este mai mare atunci când rezistența naturală și supravegherea imună sunt absente sau compromise. La un moment dat, aceste argumente păreau plauzibile și aveau chiar și un suport experimental, respectiv faptul că șoarecii atimici, lipsiți de limfocite *T* și incapabili de rejecția de alogrefe (șoarecii *Nu/Nu*), nu dezvoltau deloc tumori spontane. Dar, ulterior s-a dovedit că aceste animale au foarte dezvoltate funcțiile *NK*, celule care recunosc șiucid spontan tumorile. Descoperirea celulelor *NK* și ulterior a celor *LAK* a revalidat întrucâtva teoria supravegherii imunologice, susținută de altfel și de numeroase observații empirice privitoare la relațiile care se stabilesc între imunodepresie sau stimularea nespecifică a răspunsului imun și boala atumorală.

Este cunoscut faptul că diferite forme de stres pot provoca depresii ale funcțiilor imune, favorizând apariția tumorilor primare și metastazarea lor. Un factor de stres este "șocul", în cursul căruia au loc activarea sintezei la nivel celular a unor "proteine de șoc termic" (*HSP* = heat shock proteins) și inhibiția sintezei altor proteine normale. Sinteza *HSP* poate avea loc și în alte condiții de stres, cum ar fi cele provocate de infecțiile virale, de intoxicațiile cronice, inflamații cu eliberarea de către granulocite a unor cantități mari de radicali liberi de oxigen, intervenția unor inhibitori ai metabolismului energetic, sinteza anormală a unor neuropeptide etc.

Proteinele din familia *HSP* joacă un rol fundamental în protecția celulelor față de unele semnale generate de factorii de stres, dar în aceste condiții este modificată exprimarea echilibrată a funcțiilor proto-oncogenelor *c-fos* și *c-myc* care dețin un rol cheie în biologia celulelor normale. Mai mult, datorită localizării



lor în nucleu, produsele acestor gene sunt implicate în reglarea și exprimarea funcțională a altor gene ale căror produse acționează ca mediatori finali ce intervin în transmiterea unor semnale inter- și intracelulare. HSP dereglează funcția acestor gene, inducând, în decurs de cca. 30 de minute de la expunerea celulelor la temperaturi de 42 - 43° C, o creștere a nivelului ARN *c-fos* și o scădere a ARN *c-myc*.

Așadar, proto-oncogenele nucleare joacă un rol important în exprimarea funcțiilor imune în condiții de stres. Dereglările la acest nivel pot duce la grave tulburări și implicit la proliferări neoplazice, constatate de altfel destul de frecvent după intervenția unor factori de stres fizici, chimici, biologici sau sociali.

Dar, nu numai funcțiile proto-oncogenelor sunt influențate de către factorii stresanți. În șoc nervos, în urma intervențiilor intempestive ale unor agenți chimici sau fizici, se pot instala grave dereglări neuroendocrine care deprimă unele funcții imune și favorizează apariția tumorilor spontane. În afară de aceste date, care confirmă rolul funcțiilor imune în prevenirea sau limitarea proceselor neoplazice, mai sunt și alte observații. De exemplu, sindromul de deficit dobândit al imunității mediate celular (AIDS), generat de virusul HIV care distruge cu predilecție limfocitele *T*, este de regulă asociat clinic cu sarcomul Kaposi, o tumoră cutanată care nu apare la persoanele tinere ci numai la vârstnicii cu deficit imun. În cazuri de AIDS, sarcomul Kaposi apare generalizat și la adulții de 20 - 40 de ani. Iradierile accidentale sunt urmate de apariție în masă a tumorilor solide sau leucemiilor.

Deficitele imune, uneori inapărentate clinic, duc mai devreme sau mai târziu la instalarea bolii canceroase. Se știe că, practic, toți oamenii sunt purtători ai virusului herpetic, dar numai o foarte mică parte dintre ei prezintă forme acute de boală care apar de regulă după expunerea la ultraviolete (care favorizează exprimarea limfocitelor *Ts*), după stări grave de oboseală sau după intervenția altor factori de stres. La acești subiecți există un deficit al funcțiilor *T* și *NK*, manifestat în special în perioadele de remisie a manifestărilor clinice ale bolii. În cazul unor deficite imune grave, care din păcate nu sunt bine cunoscute de către clinicieni, apare zona-zoster, extinsă pe diverse suprafețe ale corpului, cu prinderea filetelor nervoase. După un număr de ani, acești pacienți devin canceroși într-un procent apreciabil, dar rareori se face asocierea dintre zona-zoster, ca expresie a deficitului imun, și boala neoplazică.

Un alt argument în favoarea existenței unei relații strânse între funcțiile imune și neoplazie este dat de către terapia imunomodulatoare care, de regulă, influențează pozitiv evoluția bolii. Puțini știu că de fapt boala canceroasă nu apare spontan, deși se numește "tumoră spontană". Este adevărat, prezența tumorii este descoperită brusc și în majoritatea cazurilor accidental dar, atunci când este descoperită, ea de fapt evoluează de multă vreme, din mutația inițială multiplicându-se milioane de celule "fiice".

În realitate, apariția ei este "anunțată" din timp, dar, din păcate, puțini dintre noi putem să-i recepționăm mesajele care, la început, sunt din sfera funcțiilor imune. Într-un prim stadiu pot apărea dereglări neuroendocrine manifestate prin tulburări în sinteza unor endorfine, hormoni etc., exprimate clinic prin stări de "oboseală" nejustificată, prin depresii psihice nemotivate, adinamism, dereglări menstruale, etc. Urmează o fază de susceptibilitate la diferite infecții virale, bacteriene sau fungice, exprimată clinic prin herpes repetat, stafilococii, infecții "a frigore" ale căilor respiratorii superioare, micoze etc. Desigur că acest tablou este diferit de la subiect la subiect, dar în linii generale este asemănător. În aceste faze, intervențiile prompte cu imunomodulatori pot bloca apariția procesului neoplazic. De exemplu, sunt multe femei care au suferit intervenții chirurgicale pe sân pentru



carcinoame mamare sau pentru simple "mastoze chistice" și care, după ani de zile de sănătate perfectă, constată recidiva tumorii și chiar metastaze pulmonare sau osoase, fiind definitiv condamnate. Dacă ar fi recepționat din timp "mesajele" imunodepresiei, ar fi putut evita situația dramatică prin stimularea funcțiilor imune cu ajutorul imunomodulatorilor.

**Conceptul actual în terapia antitumorală** ilustrează în fond ignoranța noastră în acest domeniu. HYOPOCRATE, încă acum două milenii și jumătate, spunea că actul terapeutic trebuie înainte de toate să nu fie vătămător (*primum non nocere* = mai întâi să nu vatămi). Medicația antitumorală actuală este departe de a respecta acest precept de o nebanuită profunzime, limitându-se, în linii mari, la trei modalități terapeutice: intervenția chirurgicală (în cazul tumorilor solide), radioterapia și chimioterapia. Toate aceste procedee de fapt se adresează în exclusivitate tumorii pe care încearcă s-o neutralizeze, nici una dintre ele neținând cont de potențialul de apărare imun, pe care uneori chiar îl deprimă. De exemplu, citostaticele sau radioterapia generalizată ținesc blocarea multiplicării, celulei maligne, dar secundar ele reduc uneori până la anulare capacitatea de apărare imună, favorizând de fapt neoplazia. Este o situație oarecum asemănătoare celei în care cineva încearcă să omoare cu o măciucă un șobolan care a ajuns și s-a ascuns într-un car cu oale. Lovind orbește în dreapta și în stânga, nu știe dacă are șanse să nimerească șobolanul, dar sigur distruge cea mai mare parte dintre oale. Radioterapia și chimioterapia supresoare sunt "măciuci" care lovesc orbește și care de foarte multe ori fac mai mult rău decât bine. Respectarea dictonului *primum non nocere* este discutabilă și în alte situații. De pildă, în fazele mai avansate ale bolii, bolnavii de cancer prezintă anemii accentuate, motiv pentru care li se recomandă medicație pe bază de ioni de Fe. Or, se știe că atât celulele prokariote cât și cele eukariote care sunt capabile de multiplicare activă, cum ar fi bacteriile sau celulele embrionare și neoplazice, au nevoie de energie. O parte din această energie este furnizată de către ionii de Fe care sunt elementul cu cele mai multe valențe:  $\text{Fe}^{2+}$  și  $\text{Fe}^{3+}$ , valențele cele mai comune, dar și  $\text{Fe}^{1+}$  și  $\text{Fe}^{5+}$ , jocul acestora eliberând energie. Pentru captarea ei, organismul este înzestrat cu transferină care poate lega ionii de Fe, iar celulele au receptori pentru transferină prin intermediul cărora leagă complexe transferină-Fe, înglobând această sursă de energie. Nu se știe în ce măsură terapia cu ioni de Fe combate anemia celor cu boală neoplazică, dar pare foarte plauzibilă influența ei benefică pentru tumoră, care este stimulată în capacitatea ei de multiplicare.

Au fost încercate imunizări antitumorale cu vaccinuri preparate din celule neoplazice întregi sau lizate, inoculate ca atare sau în asociere cu adjuvanți. Rezultatele obținute nu au fost încurajatoare.

În prezent, se preconizează unele modalități de terapie care ar folosi mijloace moderne imunologice ca de pildă:

a. Activarea exprimării de către celulele tumorale a antigenelor MHC de clasa I care să le facă mai ușor de recunoscut și ucis.

b. Stimularea exprimării genei B7 pe celulele prezentatoare de antigen și a CD28 pe limfocitele  $\text{CD4}^+$  și  $\text{CD8}^+$ , în scopul activării cooperărilor celulare (Th și Tc) care să ducă la liza tumorii de către Tc într-o manieră mult activată.

c. Inserarea de gene pentru citokine (IL-2, IL-4, IL-7, IFN, TNF, C-CSF, GM-CSF etc.) în celula tumorală, pentru ca acestea să fie produse în cantități mari chiar la locul tumorii de către tumora însăși. Inflamațiile locale rezultate ar fi fatale pentru procesul neoplazic.

Până la elucidarea teoretică a acestor probleme atât de complexe, în prezent se pare că problema bolii neoplazice trebuie abordată nu numai prin cercetări fundamentale complexe, dar și printr-o atitudine pragmatică rațională care să încerce să ajute și nu să împiedice potențialul imun de apărare al organismului. Poate că cea mai corectă conduită ar fi atacarea tumorii în condiții menajante pentru țesuturile sănătoase și stimularea concomitentă a funcțiilor sistemului imun cu ajutorul unor imunomodulatori eficienți.





## DEVIAȚIILE RĂSPUNSULUI IMUN

Caracteristicile esențiale ale efectoarelor imunității sunt abilitatea lor de recunoaștere și neutralizare a factorilor străini de organism, care pot fi nocivi pentru acesta și potențialul lor de autocontrol care le limitează activitatea menținând-o în limite strict necesare. Efectele negative, exercitate de către diverși factori externi asupra organismului, pot influența în mod hotărâtor funcțiile biologice ale acestuia și, implicit, mecanismele sale de apărare imună. De exemplu, carențele proteice asociate unor dezechilibre de aport mineral sau lipidic pot genera paralizii imunologice sau răspunsuri paradoxale la stimulii antigenici normali.

De regulă, orice stimul antigenic declanșează o cascadă de reacții imune finalizate prin eliminarea agresorului exogen sau endogen și restabilirea funcțiilor normale ale organismului. Efectul protector al răspunsului imun reprezintă caracteristica sa dominantă care definește situația de "normal". Pentru a reacționa corect la un stimul antigenic dat sau pentru a realiza autoprotecția, sistemul imun își are dezvoltate o serie de mecanisme specifice și nespecifice, care limitează până la anulare posibilitatea instalării unor anomalii, rămânând exprimate numai acele funcții care au rol benefic, de lichidare a agresorilor nocivi.

Mecanismele prin care acesta își exercită monumentală sarcină de a realiza distincția dintre "benefic" și "vătămător" nu sunt încă perfect cunoscute, din care cauză au fost postulate o serie de scenarii:

- a) celulele responsabile cu prezentarea antigenului pot distinge între "propriu" și "străin", evitând să prezinte proteinele proprii celulelor efectoare ale imunității;
- b) celulele care ar fi capabile să reacționeze cu componentele proprii ale organismului sunt eliminate în cursul dezvoltării ontogenice;
- c) sistemul imun are celule specializate în limitarea sau evitarea unor deviații de la normal a reacțiilor specifice și nespecifice de apărare.

Cu toate acestea, uneori, apărarea imună se abate de la limitele normale în sensul, fie că nu se instalează, fie că reacționează prea brutal sau greșit orientat. Ar exista următoarele direcții principale de evoluție anormală a răspunsului imun:

1. Lipsă de răspuns, exprimată prin "toleranță", adică prin "acceptarea" elementului străin sau, în cazuri dramatice, prin "paralizie imunologică". Toleranța față de antigenele străine recunoscute ca atare de către efectoarele sistemului imun, sub restricție MHC, poate fi definită din punct de vedere operațional ca o acceptare pe termen lung a acesteia, iar din punct de vedere funcțional, ca o lipsă de răspuns specifică a limfocitelor B sau T helper (toleranță la antigenele asociate cu moleculele MHC de clasa a II-a) sau T citotoxice (toleranță la antigenele asociate cu moleculele MHC de clasa I).



2. Răspuns exagerat, cu o intensitate care depășește cu mult limitele fiziologice și care antrenează diferite populații moleculare și celulare, care prin "explozia" lor funcțională devin nocive pentru organism (reacții de "hipersensibilitate").

3. Reacții de autoagresiune, de autodistrugere, ca urmare a recunoașterii ca străine a propriilor structuri antigenice. Acestea, cunoscute și sub denumirea de "reacții autoimune" sau "autoimunitate", nu se deosebesc de cele normale decât prin orientarea lor, acționând prin mecanisme comune funcțiilor normale ale imunității, dar nu împotriva agresorilor străini, ci împotriva propriului organism.

În prima situație este vorba de o inhibiție sau de o anulare a răspunsului imun, în cea de a doua de o exagerare, iar în ultima, de o orientare greșită a lui.

## TOLERANȚA IMUNOLOGICĂ

P.EHRLICH, la începutul acestui secol, a lansat ideea că organismul are "oroare de autodistrugere" ("horror autotoxicus"), fiind capabil să facă distincția dintre structurile proprii, pe care le tolerează, și cele străine, pe care le respinge. În anii următori, s-a constatat că, în anumite condiții, există situații în care organismul nu respinge ci acceptă elementele străine.

Dintre condițiile care favorizează acest proces au fost semnalate următoarele:

- inocularea la persoanele adulte a unor doze mari de antigen;
- inocularea de doze normale de antigen la organisme aflate în stadiul embrionar de dezvoltare.

În anul 1945, R.A. OWEN semnalează un fapt care aparent contravenea conceptului lui P.EHRLICH. Două vițele gemene, dar cu genotipuri diferite, aveau fiecare în circulație, în afară de hematii proprii, și hematii provenite de la sora geamănă, fără a exista nici o tendință de eliminare a lor. Era o situație paradoxală, de acceptare ca proprii, a unor elemente străine de organism. Deoarece celulele aparțineau la două genotipuri diferite, OWEN denumesc acest fenomen "himerism" și consideră instalarea lui ca o consecință a circulației sangvine realizată printr-o placenta unică. Aproximativ în același timp, R.F. BILLINGHAM, L.BRENT și P.B.MEDAWAR inoculează la embrioni de șoarece aparținând unei tulpini consangvine, să-i zicem tulpina "X", limfocite preluate de la șoarecii aparținând altei tulpini consangvine "Y". La vârsta adultă, șoarecii "X" inoculați cu limfocitele șoarecilor "Y" acceptă grefa de piele aparținând șoarecilor "Y", dar nu și grefele de piele provenite de la alte tulpini de șoarece. Șoarecii "X" neinoculați prénatal cu limfocitele șoarecilor "Y" au respins grefa de piele "Y".

Pe baza experimentelor de acest gen, s-a ajuns la concluzia că sistemul imun, în timpul dezvoltării sale ontogenice, "inventariază" antigenele cu care vine în contact, recunoscându-le ca proprii. Cele care au lipsit de la "inventariere" sunt considerate ca străine și eliminate. În acest fel, se realizează lipsa de răspuns sau "toleranța imunologică" față de antigenele proprii și posibilitatea de a dezvolta reacții imune față de cele străine. Structurile proprii organismului, care nu sunt "inventariate", sunt considerate ca străine și, în cazul în care vin în contact cu efectoarele imunității, sunt eliminate. Deci, toleranța este o stare de lipsă de răspuns specific, sau de răspuns slab, indusă prin expunerea anterioară la un antigen dat, ea putând fi generată de către orice antigen. Este antigen-specifică, organismul putând reacționa perfect normal față de toate celelalte antigene, tolerându-le doar pe cele pe care le-a cunoscut în cursul evoluției sale ontogenice.



când le-a recunoscut ca proprii, sau pe cele care au suprimat clonele de limfocite implicate în răspunsul specific.

Faptul, că starea de toleranță poate fi transferată de la un organism la altul prin celule dar nu prin ser, este o dovadă a intervenției factorilor celulari și nu a celor umorali în instalarea ei.

Așadar, este lesne de înțeles că alterările profunde care intervin la om sub influența diferiților factori de mediu pot fi surse potențiale de modificări în reactivitatea imună a produșilor de concepție, cu serioase consecințe de ordin biologic.

În prezent se acceptă existența a trei mecanisme principale care ar sta la baza instalării și persistenței toleranței imunologice și care, la rândul lor, sunt condiționate de către o serie de factori (tabelul 113) dependenți de organismul gazdă. În linii mari, mecanismele care pot genera toleranța sunt absența, blocada sau supresia activă a funcțiilor clonei de limfocite cu receptori pentru antigenul implicat.

Tabelul 113

**Diversi factori care influențează instalarea toleranței imunologice (după J.A. Belanti)**

Imaturitatea imunologică
Factori genetici
Caracteristicile antigenului:
- complexitatea moleculei
- starea fizică a moleculei
- capacitatea de dispersare în organism
Doza de antigen
Persistența antigenului în organism
Calea de inoculare

Factorii cei mai importanți care condiționează aceste mecanisme sunt:

1. **Vârsta.** La embrioni sau nou-născuți, ale căror limfocite nu sunt încă mature funcțional, antigenul, în anumite doze, nu declanșează reacții imune ci toleranță imunologică, deoarece clona de celule ori este "sufocată", pierzându-și ireversibil sau reversibil capacitatea sa funcțională, ori este pur și simplu eliminată. Dacă, de exemplu, mieii în stare de dezvoltare fetală au fost inoculați cu un antigen oarecare, după naștere ei nu vor răspunde imun la stimulul cu acel antigen, dar vor răspunde față de toate celelalte antigene. Așa s-ar explica toleranța la antigenele "proprii" ale organismului: limfocitele au "inventariat" tot ce era prezent și au recunoscut ca "proprii" chiar și acele structuri care de fapt erau străine de organism dar care erau la "fața locului" în momentul "inventarului". Un fel de "pui de cuc în cuib străin". Clona de celule cu receptori specifici pentru acești determinanți își pierde receptorii, nu mai "vede" determinanții și devine "mută", fiind represată funcțional pentru toată viața, în cazul antigenelor proprii, sau pentru o perioadă variabilă de timp în cazul celor non-proprii.

2. **Absența clonei antigen-reactive (deleție).** Eliminarea clonei limfocitare cu receptori specifici pentru un determinant antigenic este urmată de toleranță imunologică. De exemplu, dacă se iriază letal șoareci care sunt apoi reconstituiți cu o populație de limfocite, din care prin cromatografie de afinitate a fost

îndepărtată clona respectivă, animalele reconstituite devin tolerante pentru antigenul recunoscut de către clona eliminată. Același mecanism intervine și atunci când antigenul este asociat cu o toxină sau cu izotopi radioactivi; inoculat, el va transporta la celulele cu receptori specifici pentru el otrava sau izotopii, care o vor distruge. Animalele astfel tratate vor răspunde normal la toți ceilalți stimuli, în afară de cel pentru care nu mai au celule. Eliminarea (deleția) clonei de limfocite este unul dintre principalele mecanisme prin care se realizează toleranța în timpul maturării precursorilor celulari în organele limfoide primare și în special în timus.

3. *Complexitatea moleculei de antigen.* Substanțele cu o configurație simplă și cu o greutate moleculară mică, care pot persista mult timp în organism, sunt mai tolerogene decât cele cu molecula complexă.

4. *Starea fizică a moleculei de antigen.* Polimerii moleculari sunt buni imunogeni, iar monomerii, buni tolerogeni. De exemplu, molecula de IgG în forma sa monomerică poate induce toleranță, dar atunci când polimerizează nu mai este tolerogenă. De aici concluzia că, în cazul administrării în scop terapeutic de gammaglobuline, este indicat ca moleculele să fie administrate sub formă monomerică și nu polimerică, pentru a nu stimula reacții imune față de ele.

5. *Doza de antigen* are un rol covârșitor. Există toleranță de "zonă joasă" sau de "zonă înaltă", instalate consecutiv inoculărilor voite sau accidentale a unor doze mici sau mari de antigen (fig. 205). Toleranța de "zonă joasă" poate fi indusă de către un număr mic de antigene și interesează în exclusivitate limfocitele T deoarece ea activează funcțiile celulelor T supresoare (Ts). Toleranța de "zonă înaltă", prin exces de antigen, poate interesa ambele populații de limfocite T sau B și poate fi realizată de majoritatea antigenelor. Limfocitele T pot deveni tolerante la doze de antigen de 100-1 000 de ori mai mici decât limfocitele B, la care chiar și viteza de instalare a toleranței este mai lentă: în decurs de ore în cazul limfocitelor T și de zile în cel al limfocitelor B.

6. *Persistența antigenului* este o altă condiție esențială. Antigenele solubile induc răspuns imun dacă sunt inoculate intradermic împreună cu un adjuvant, dar pot deveni tolerogene atunci când sunt inoculate pe cale intravenoasă. Este posibil ca, de fapt, nu calea de administrare să determine aceste reacții diferite, ci tot doza de antigen. Intradermic nu se poate inocula decât o cantitate limitată,

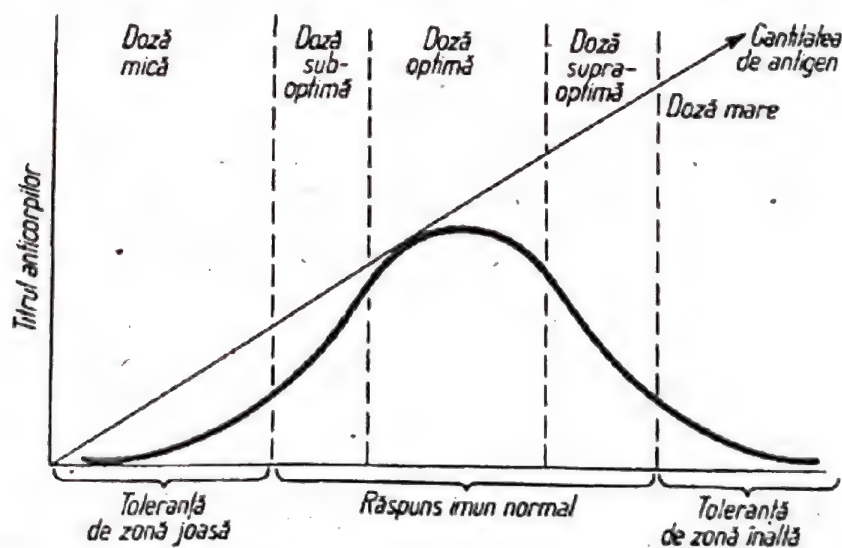


Fig. 205. Relația dintre doza de antigen și toleranța imunologică. "Toleranța de zonă joasă" se instalează consecutiv inoculării unor cantități mici de antigen, iar cea de "zonă înaltă" după inoculul de doze mari de antigen. Doza optimă induce răspuns imun normal.



pe când intravenos se pot inocula cantități mari care facilitează instalarea toleranței de "zonă înaltă".

Spre deosebire de "paralizia imunologică" sau imunosupresie, unde lipsa de răspuns este generală, interesând toate clonele de limfocite (policlonală), toleranța, ca și reacția imună normală, se caracterizează printr-un înalt grad de specificitate. Limfocitele *T* și eventual și cele *B* pot fi tolerante pentru un singur epitop și reactive pentru toți ceilalți determinanți antigenici existenți în natură.

În linii generale, această stare de reactivitate a organismului se caracterizează prin următoarele:

a. Nu este transmisibilă genetic ci dobândită somatic. Organismul poate deveni tolerant față de un epitop oarecare pentru un anumit timp, dar nu transmite și nici nu recepționează în linia sa germinativă acest atribut.

b. Este "cantitativă" și nu "calitativă". Acceptarea elementelor străine poate lipsi cu desăvârșire și atunci se declanșează reacțiile imune, sau poate fi prezentă și atunci se instalează lipsa de răspuns pentru o durată mai lungă sau mai scurtă de timp. De fapt, toleranța absolută nu există, deoarece în stare "latentă" mai există unele limfocite capabile să declanșeze reacții imune chiar față de țesuturile organismului propriu. Așa s-ar explica apariția unor reacții autoimune. Numărul mic al acestor celule, slaba exprimare a receptorilor de membrană pentru antigenele proprii și intervenția diversilor factori supresori determină areactivitatea lor.

c. Este reversibilă, dispărând o dată cu factorii care au favorizat inducerea sau menținerea ei (persistența antigenului, refacerea clonei, intervenția unor produse supresoare sau citotoxice etc.). Acest caracter are o deosebită importanță practică în sensul că, prin normalizarea unor condiții de microclimat, se pot redresa situații care par a fi ireversibile.

d. Poate fi realizată printr-o simplă "claustrare" a antigenelor, care devin inaccesibile sistemului imun. Spermatozoizii, mielina din țesutul nervos, unii hormoni etc. sunt perfect izolați de restul organismului, izolare care permite coexistența lor cu sistemul imun. În cazul unor eliminări accidentale a barierelor izolatoare se declanșează reacții imune de respingere a antigenelor respective.

Lipsa răspunsului imun specific poate fi indusă nu numai neonatal, la organisme imature imunologic, dar și la adulții imunocompetenți. În general, datorită limfocitelor *B*, inducerea areactivității la imaturii imunologic este mai ușor de realizat decât la adulți.

Pot deveni tolerante atât limfocitele *T* cât și cele *B*, dar căile de inducere și susceptibilitatea acestor două clase de celule sunt diferite; limfocitele *T* devin ușor tolerante nu numai în cursul dezvoltării lor ontogenice dar și la maturitate, pe când limfocitele *B* pot deveni tolerante în ontogenie dar nu și atunci când devin mature funcțional. Mai exact, cu cât celulele *B* au evoluat pe linia maturării lor cu atât devin mai greu reactive, doza de antigene timo-independente sau timo-dependente necesară pentru realizarea acestei situații trebuind să fie din ce în ce mai mare. Se apreciază că, pentru a deveni tolerante, limfocitele *B* mature necesită doze de antigen de 100 de ori mai mari decât cele tinere. Relația existentă între susceptibilitatea la toleranță și gradul de maturitate a celulelor *B* (tabelul 114) influențează și căile posibile de inducere a ei (tabelul 115). Acestea nu sunt bine cunoscute, dar se pare că sunt multiple și că nu se exclud mutual. Ele ar acționa fie prevenind proliferarea sau diferențierea celulelor *B*, fie blocând secreția de imunoglobulină, generarea celulelor de memorie sau comutarea spre alte clase de imunoglobulină.

Tabelul 114

Susceptibilitatea la toleranță a limfocitelor B de șoarece  
în relație cu gradul lor de maturitate (după D.W. Scott)

Gradul de maturare a celulelor	Fenotip			Susceptibilitatea la toleranță
	IgM	IgD	Ia	
Pro-B	-	-	-	Rezistent
B timpuriu	+	-	-	Sensibil
B imatur	+	±	?	Sensibil
B matur	+	+	+	Rezistent

Limfocitele *B* pot tolera atât antigenele timo-dependente cât și antigenele timo-independente. Spre deosebire de ele, limfocitele *T* devin tolerante numai față de antigenele timo-dependente. Deși efectul este același, mecanismele de instalare a toleranței la aceste două clase de celule este fundamental diferit. În cazul limfocitelor *B*, ar exista patru modalități majore de inducere a ei (fig. 206). Este cazul "eliminării" clonei de celule *B* de către un antigen cu care această celulă a venit în contact și care era în doze necorespunzătoare, al "pierderii funcției" ca urmare a imposibilității de a primi semnale ajutătoare de la celulele *Th*, sau prin blocarea acestora de către concentrațiile mari de antigen. Faptul, că în

Tabelul 115

Căi posibile de inducere a toleranței la nivelul limfocitelor B (după D.W.Scott)

a. Imposibilitatea de a resintetiza receptorii modulați
b. Blocarea transmisiei semnalelor intracelulare
c. Blocarea receptorilor pentru antigen sau pentru citokine
d. Lipsa semnalelor generate de către receptori IgD
e. Interferențe funcționale cu receptori pentru interleukine sau factori mitogeni
f. Imposibilitatea cooperării cu macrofagele
g. imposibilitatea primirii semnalului II costimulator, eliberat de macrofage, limfocitele T sau LPS
h. Moartea celulelor aparținând clonei reactive pentru un antigen

prezența limfocitelor *Th* celulele *B* nu mai pot fi făcute tolerante, a generat părerea că potențialul tolerogen al antigenului depinde în mare măsură de imunogenitatea grupării sale purtătoare. În realitate, însă, natura moleculară a antigenului este mai importantă decât imunogenitatea sa. De exemplu, celulele *B* ale șoarecilor nou-născuți pot deveni tolerante la gammaglobulina umană sau albumina serică bovină. În primul caz, toleranța este instalată ca urmare a eliminării (deleției) clonelor de celule *B* incompetente imunologic, iar în cazul albuminei ea apare consecutiv generării de limfocite *Ts* specifice pentru gruparea purtătoare a acesteia. De asemenea și macrofagelor supresoare le revine un rol important în instalarea acestui gen de areactivitate la nivelul limfocitelor *B*.

Așadar, limfocitele *B* pot deveni tolerante prin: a) deleție clonală centrală (în măduva osoasă) sau periferică; b) acțiunea unor factori imunosupresoari;



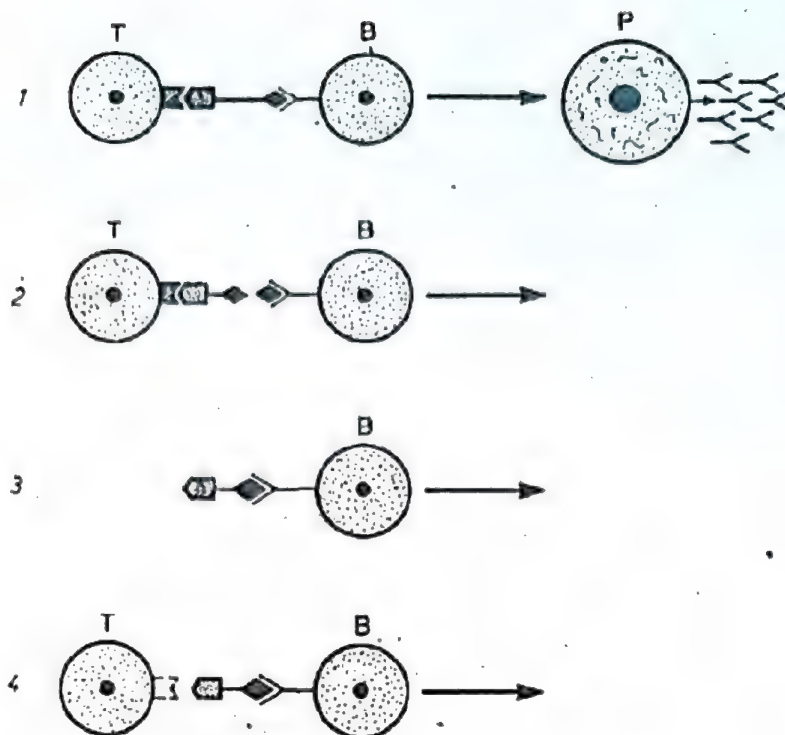


Fig.206. Inducerea toleranței limfocitelor B la antigene timodependente.

1. Limfocitul B primește semnale de la limfocitul T prin puntea de antigen și evoluează spre plasmocit.
2. Receptorul pentru antigen de pe limfocitul B sau T este blocat datorită inoculărilor repetate de doze mici sau mari de antigen.
3. Lipsește clona de limfocite T, cu receptori pentru antigen.
4. Limfocitele T ajutătoare au devenit tolerogene. Ele posedă receptori pentru antigenul respectiv, dar nu pot reacționa la semnalele acestora și, deci, nu pot stimula celulele B.

c) absența limfocitelor  $T_h$  și d) blocarea idiotipului receptorilor lor de către anticorpi anti-idiotip.

În cazul limfocitelor  $T$ , toleranța poate fi indusă cu ușurință atât la populațiile mature cât și la cele imature, necesitând pentru aceasta cantități mici de antigene, de ordinul microgramelor, în comparație cu limfocitele  $B$  care necesită pentru același scop cantități de ordinul miligramelor. Și căile de inducere a ei sunt, în mare parte, diferite la celulele  $T$  față de cele  $B$  (tabelul 116). În cazul limfocitelor  $T$  mature, toleranța poate fi instalată ca urmare a eliminării populațiilor de celule efectoare ( $T_c$ ) sau a activării celor  $T_s$ . De regulă, are loc eliminarea celulelor  $T_h$  care se face mai rapid decât generarea celor  $T_s$  și care persistă chiar și atunci când  $T_s$  au fost reduse la limite normale. Se pare că toleranța indusă prin depleția celulelor  $T$  diferă, cel puțin în stadiile ei inițiale, de cea realizată prin depleția limfocitelor  $B$ , în special în ce privește doza și structura antigenului utilizat în acest scop. Desigur, mai există o deosebire esențială între aceste două populații de limfocite. După cum se știe, limfocitele  $B$  sunt practic unifuncționale, în sensul că au doar menirea să sintetizeze anticorpi și eventual să fie celule antigen-prezentatoare și reglatoare, în timp ce limfocitele  $T$  au funcții diferite, cum ar fi cele ajutătoare ( $T_h$ ), citotoxice ( $T_c$ ), supresoare ( $T_s$ ) etc., toleranța putând interesa una sau alta dintre aceste subpopulații.

## Căi posibile de inducere a toleranței limfocitelor (după D.W.Scott)

- a. Prin deficit funcțional al macrofagelor (nu pot prezenta antigenul sau nu-l pot asocia cu molecule MHC)
- b. Defecte în recepționarea celui de al II-lea semnal (IL-1)
- c. Sinteza de IL-2 este absentă sau defectuoasă
- d. Celula nu poate exprima receptorii pentru IL-2
- e. Sinteza limfokinelor activatoare este depresată
- f. Intervenția exagerată a unor circuite supresoare
- g. Moartea celulelor

După cum aminteam în capitolele anterioare, limfocitele *T*, în cursul maturării lor, devin tolerante la antigenele MHC proprii și discriminatorii față de cele străine. Datele experimentale au demonstrat clar că antigenele MHC care sunt prezente în timpul dezvoltării celulei *T* sunt ulterior tolerate și de către acestea, modelele experimentale cele mai utilizate pentru astfel de scopuri fiind inoculul de celule alogene la șoarecii nou-născuți. Desigur, deleția clonală a celulelor autoreactive este un mecanism major de inducere a lipsei de răspuns față de "propriu", ea fiind realizată de către celulele dendritice și macrofagele derivate din măduva osoasă și ajunse în zona medulară a timusului.

Dar nu se poate ca toate proteinele proprii să fie exprimate în timus pentru a induce "deleția clonală", de unde concluzia că trebuie să existe și alte mecanisme care să asigure tolerarea antigenelor proprii. De aceea se pare că, la nivelul acestui organ, eliminarea clonei nu este singurul mecanism care poate genera anularea funcțională a clonei sau clonelor de celule autoreactive. De exemplu, tratamentul cu  $\text{Ca}^{2+}$  induce anergie, influxul acestor ioni fiind tolerogenic pentru celulele *T* în absența altor semnale. În timus, la nivelul stratului epitelial cortical, toleranța poate fi indusă prin mecanisme non-deleționale care constau din instalarea unei anergii și supresii clonale realizate prin mecanisme încă necunoscute. Atât celulele corticale cât și cele medulare ale acestui organ exprimă antigene MHC de clasa II, tolerizarea precursorilor *T* fiind condiționată de starea lor de maturare, semnalele costimulatoare eliberate de către macrofage sau celulele dendritice activând limfocitele *T* aflate în faze avansate de maturare și eliminându-le pe cele foarte tinere, care au reușit să treacă de bariera corticală și să ajungă în medulară.

În periferie, limfocitele *T* ar fi susceptibile la toleranță imediat după ce au părăsit timusul, fie din cauza imposibilității de colaborare cu alte limfocite *T*, fie din cauza prezentării antigenelor de către celulele APC "neprofesionale", lipsite de liganzii esențiali. Intervenția unor limfokine cu rol "blocant" ar favoriza instalarea toleranței (fig. 207).

Pot deveni tolerante limfocitele *Th*, situație în care efectul este exprimat în special prin intermediul celulelor *B* (nu mai are loc sinteza de anticorpi), limfocitele *T* de hipersensibilitate de tip întârziat (*Td*), cele *T* citotoxice etc. În caz de toleranță a *Td*, de exemplu, unii subiecți, deși sunt bolnavi de tuberculoză, reacționează negativ la inoculul intradermic cu PPD, fiind în mod eronat considerați ca indemni de această boală. Precursorii limfocitari *Tc* devin toleranți când vin în contact cu doze mari de antigen asociate cu antigenele de clasa I ale complexului MHC, iar



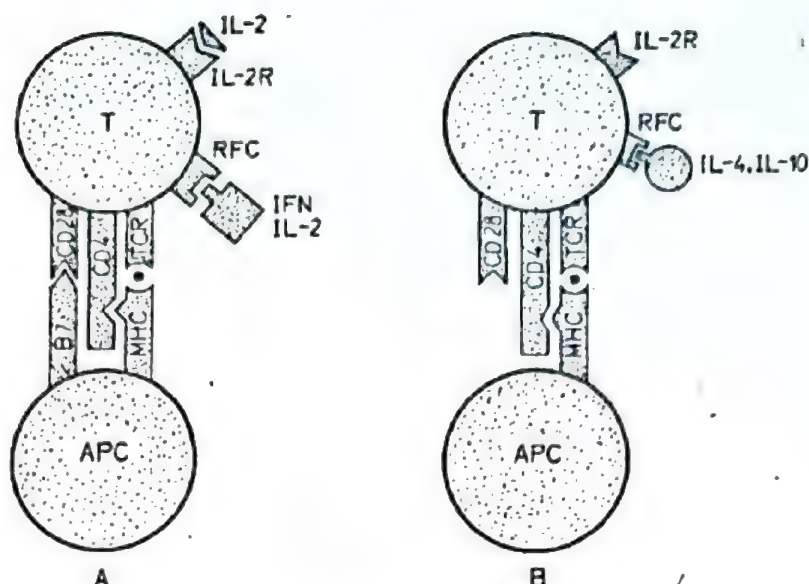


Fig.207. Model ipotetic de realizare a toleranței limfocitelor T pentru antigenele proprii.

În situația A, limfocitul T devine activ deoarece aderă la celulele prezentatoare de antigen și primește semnale stimulatorii de la IFN sau IL-2 prin receptorii pentru "factorii de creștere" (RFC).

B. Celulele prezentatoare de antigen (APC) nu sunt "profesionale" fiind lipsite de moleculele B7. Limfocitul T primește semnale numai de la IL-4 sau IL-10 (după H. Waldman și S. Cobbold).

cei Th când sunt expuși la antigene asociate cu moleculele de clasa II de MHC. În cazul intervenției celulelor Ts, se realizează o supresie antigen specifică atât la nivelul populației T cât și al celei B. După cum spuneam, limfocitele B pot deveni tolerante atât la antigenele timo-independente, care au o remanență mare în organism, mai ales atunci când sunt inoculate în doze mari, cât și la antigenele timodependente, situație în care sunt implicate și limfocitele Th.

În general, populația de celule T devine tolerantă la doze mici de antigene inoculate singure, sau asociate cu diverse preparate imunosupresoare. Dintre acestea, foarte eficientă este ciclofosfamida care are două modalități principale de acțiune: a) prin scăderea pragului inferior de realizare a toleranței și b) prin blocarea secvențelor de diferențiere în cursul trecerii celulelor de la celulă de memorie la celulă efectoare. De altfel, ciclofosfamida acționează și asupra limfocitelor B, inhibându-le exprimarea receptorilor de membrană pentru antigene. În afară de ciclofosfamidă, instalarea arăactivității de acest gen mai poate fi facilitată și de către anticorpii anti-idiotip, de serul antilimfocitar, responsabil nu numai de generarea toleranței dar și de imunosupresie, de corticosteroizi, de diverse substanțe citotoxice etc.

Toleranța imunologică are efecte negative, în sensul că pune în imposibilitate organismul să înlăture substanțe care îi sunt străine, dar are și efecte pozitive. Unul dintre acestea este însăși tolerarea propriilor structuri care, dacă nu s-ar realiza, ar putea duce la autodistrugere prin propriile mijloace de apărare. Uneori este de dorit realizarea toleranței imunologice față de anumite antigene. Este cazul reacțiilor alergice exagerat de intense, sau al unor grefe de organe sau țesuturi a căror respingere imună constituie o piedică în terapia unor deficite fiziologice de importanță vitală pentru existența organismului.

## HIPERSENSIBILITATEA IMUNOLOGICĂ

Toleranța imunologică, această stare de areactivitate totală sau parțială, tranzitorie sau persistentă față de unul sau mai mulți determinanți antigenici, poate fi considerată ca o "deviație normală", atunci când este vorba de antigenele organismului propriu, sau ca o deviație "patologică", atunci când areactivitatea este direcționată către antigene străine de organism.

Spre deosebire de toleranță, reacțiile imune violente, cunoscute sub termenul generic de "alergii", definesc o "hipersensibilitate" la antigene străine de organism, dar nu și la cele proprii organismului. Mecanismele care stau la baza reacțiilor de hipersensibilitate nu diferă fundamental de cele care definesc răspunsul imun normal; deosebirile constau doar în intensitatea manifestării și tipul de celule care este responsabil de declanșarea lor. Spre deosebire de răspunsul imun normal, hipersensibilitatea se instalează după contacte repetate cu alergenul și are un caracter individual: dintr-un număr mare de indivizi expuși aceluiași stimul, numai unii vor dezvolta reacții alergice (de la cuvântul grec *allos* = altfel). Principiul declanșării acestora este similar reacțiilor antigen-anticorp normale, diferind doar clasa de imunoglobuline implicată, IgE în loc de IgM sau IgG.

S-a încercat clasificarea reacțiilor de hipersensibilitate ținându-se cont de diferite criterii, cum ar fi: natura efectorului (reacții *mediate de anticorpi* și reacții *mediate celular*), timpul de declanșare a lor după contactul cu antigenul (de *tip imediat* sau de *tip întârziat*) etc.

Ținând cont de aceste criterii, precum și de complexitatea manifestărilor clinice, P.G.H.GELL și R.R.A.COOMBS au grupat reacțiile de hipersensibilitate în patru tipuri, și anume:

1. Hipersensibilitate imediată de tip I, anafilactică sau de "tip reaginic".
2. Hipersensibilitate imediată de tip II, citotoxic-citolitică, mediată prin anticorpi.
3. Hipersensibilitate de tip III mediată de complexe imune.
4. Hipersensibilitate de tip IV sau de "tip întârziat" (tuberculinic).

Primele trei sunt mediate de către anticorpi, iar ultima de către limfocitele T de "hipersensibilitate de tip întârziat" ( $T_d$ ), la care își pot aduce contribuția și macrofagele.

### HIPERSENSIBILITATEA IMEDIATĂ DE TIP I SAU "ANAFILACTICĂ"

Este provocată de către anticorpii din clasa IgE care sunt denumiți din această cauză și "reagine", caracteristica ei majoră fiind apariția rapidă a leziunilor, la câteva minute după expunerea la alergen, ca urmare a fixării moleculelor IgE pe membrana mastocitelor și granulocitelor bazofile. La un nou stimul cu același antigen, acesta se va fixa la situsul combinativ al moleculelor IgE atașate prin fragmentul  $F_c$  la receptori pentru  $F_c$  de pe celulele mediatore, fixare care declanșează un influx de  $Ca^{2+}$ , activarea fosfolipazei  $A_2$  ( $PLA_2$ ), degranularea, rezultată din fuzionarea granulelor mastocitelor cu membrana plasmocitară și eliberarea de amine vasoactive și spasmogene care vor provoca *urticarie*, *astm*



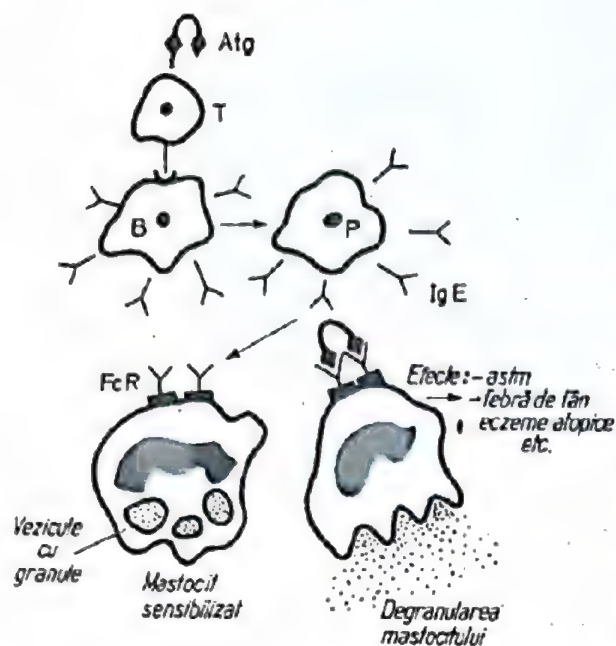


Fig.208. Modul de instalare a reacțiilor de hipersensibilitate de tip I. Antigenul stimulează limfocitele T, care vor coopera cu B și vor antrena transformarea acestora în plasmocite secretoare de anticorpi din clasa IgE (reagine). Moleculele de IgE se fixează prin Fc la FcεR de pe membrana mastocitelor declanșând degranularea acestora și eliberarea extracelular de mediatori solubili. Urmează instalarea simptomelor clinice (astm, urticarie etc.).

și "anafilactică", termen folosit pentru prima dată de către Ch.RICHET și P.PORTIER în anul 1902 și care înseamnă "lipsă de protecție" (*ana* = lipsă; *philaxia* = protecție). Se mai numește și "reacție atopică", termen prin care se înțelege declanșarea unui răspuns imun anormal la stimuli antigenici normali. Este deci o reacție antigen-anticorp în care antigenul se cuplează la anticorpii prefixați pe anumite celule cărora le activează o serie de enzime. Acestea, în condițiile unui influx crescut de  $Ca^{2+}$ , vor stimula eliberarea de către celule a diverși mediatori cum ar fi histamina, bradikina, diverși factori chemotactici, factori de aglutinare a trombocitelor etc. Prostaglandinele și leucotrienele, produse ale metabolismului acidului arahidonic, contribuie la întârzierea reacției care, în acest caz, apare după câteva ore și nu după câteva minute de la contactul cu antigenul.

Prima descriere a mecanismelor reacțiilor alergice au făcut-o C.W.PRAUSNITZ și H.KÜNSTER în anul 1921 care au arătat că "reagina", un factor seric, poate transfera pasiv starea de hipersensibilitate. De-abia în anul 1966, K. ISHIZAKA și colab. demonstrează că "reagina" este de fapt o nouă clasă de imunoglobuline, și anume clasa IgE.

După localizarea lor, reacțiile anafilactice sunt de două feluri: a) locale, situație în care reacția antigen-anticorp este limitată la nivelul pielii (urticarie, eczeme), bronhiilor (astm, spasm bronșic) etc. și b) sistemice sau generale, când interesează toate funcțiile organismului. De exemplu, dacă se inoculează alergenul (un ser, un medicament etc.) parenteral, după un inocul secundar realizat tot parenteral, se instalează imediat vasodilatația și scăderea tensiunii, creșterea permeabilității vasculare, edem glotic, spasm bronșic, alterări respiratorii și circulatorii

bronșic, febră de fân, rinite, șoc anafilactic etc. (fig. 208). De fapt, eliberarea aminelor vasoactive din celulele efectoare amintite poate fi declanșată în orice situație care realizează legarea încrucișată a receptorilor Fcε de pe mastocite sau bazofile și care induc atât degranularea cât și activarea PLA<sub>2</sub> care, la rândul ei, va activa metabolismul acidului arahidonic (v. fig. 39).

Activitatea PLA<sub>2</sub> este total dependentă de translocarea  $Ca^{2+}$  din citosol către membrană, proces care are loc în 50 - 100 de secunde de la stimularea celulei. După ce receptorii sunt agregați, urmează un proces de fosforilare a lor cu alte molecule începând cu cea a tirozinelor, știut fiind că tirozinkinaza  $p^{56fyn}$  și  $pp^{60c-src}$  sunt asociate cu FcεRI. Agregarea acestui receptor recrutează o tirozinkinază și probabil o PLC- $\gamma$ 1, stimulând replicarea ARNm într-o manieră protein-kinază C (PKC)-dependentă.

Acest tip de reacție se numește

și moarte prin "șoc anafilactic" (tabelul 117). Dacă alergenul ajunge în organism pe cale digestivă, apare "urticaria", un sindrom caracterizat printr-o ușoară stare subfebrilă și edeme cutanate bine delimitate.

Tabelul 117

Mediatori solubili eliberați în cursul reacțiilor de hipersensibilitate de tip I sau "reaginic"

Mediatorul	Eliberat de către	Efecte biologice
Histamina	Bazofile Eozinofile	Vasodilatația capilarelor Crește permeabilitatea capilarelor Constricția mușchilor netezi Crește secreția de mucus Provoacă edemul mucoaselor
Bradikinina*	Mastocite Bazofile Eozinofile	Vasodilatația capilarelor Creșterea lentă a permeabilității capilarelor
Hidroxitriptamina	Trombocite Mastocite	Constricția vaselor mari Mărește permeabilitatea capilarelor Constrictor al mușchilor netezi
Factorul de activare a trombocitelor (PAF)	Mastocite Bazofile	Stimulează eliberarea aminelor vasoactive de către trombocite Stimulează formarea de microtrombuși
Prostaglandina D <sub>2</sub>	Mastocite Bazofile Macrofage etc.	Constricția mușchilor netezi Vasodilatație Edem al mucoaselor
Leucotriene (LTA, Mastocite LTB <sub>4</sub> , LTC, LTD <sub>4</sub> etc.)	Mastocite Bazofile Neutrofile	Provoacă dilatarea capilarelor Măresc permeabilizarea vaselor

\*Bradikinina (*bradi* = lent; *kini* = acțiune)

Inițial nu a fost acceptată ideea că astmul bronșic este consecința unui proces inflamator. În prezent se acceptă existența unui astfel de proces în care granulocitele eozinofile și probabil și cele PMN au un rol important în declanșarea și mai ales în menținerea bolii. În afară de rolul anticorpilor IgE, nu este exclus ca, datorită unor dereglări în cooperarea Th-granulocite pe de o parte și în mecanismele de autocontrol al funcțiilor toxice ale granulocitelor pe de altă parte, acestea din urmă, atunci când sunt stimulate de prezența la nivelul mucoasei bronșice a unor germeni patogeni sau nepatogeni, să elibereze, în afara oricărui control, cantități mari de radicali toxici de oxigen.

Dereglarea în sinteza unor enzime cu rol reglator al eliberării acestor radicali (SOD, catalază etc.) la nivelul eozinofilelor sau PMN face imposibilă blocarea proceselor oxidative așa că, pe măsură ce se eliberează cantități crescute de O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> etc., se vor amplifica și leziunile tisulare datorită arderilor excesive. Detritusurile celulare vor elibera factori chemotactici care vor "chema" tot mai multe



granulocite, instalându-se în acest fel un cerc vicios nociv, care nu poate fi oprit prin medicații supresoare ci doar printr-o terapie specifică (autovaccin obținut din flora traheo-bronșică a pacientului) asociată cu una imunomodulatoare (Cantastim) care să readucă în limite normale funcțiile de control ale celulelor Th. Rezultatele clinice obținute prin această conduită terapeutică sunt încurajatoare, confirmând ipoteza.

Este cunoscut faptul că la atopici nivelul IgE seric este crescut, iar numărul receptorilor pentru această clasă de imunoglobuline pe mastocite, eozinofile etc. este de 5 - 10 ori mai mare decât la normali. Sinteza IgE este controlată de către limfocitele Th<sub>2</sub> supuse acțiunii IL-4, citokinele eliberate de Th<sub>2</sub> (IL-4, IL-5, IL-10) activând la rândul lor multiplicarea progenitorilor eozinofilici și mastocitari și, deci, eliberarea mediatorilor solubili cu rol în acest tip de hipersensibilitate. Într-adevăr, în lavajul bronșic al astmaticilor este prezentă o cantitate mare de IL-5 care ar explica lanțul rejecional limfocit Th<sub>2</sub> → citokine → activare granulocitară (vezi fig. 50). Dar nu este exclus ca acest lanț să aibă loc, în astmul bronșic infecțios, în primele faze ale bolii, după care s-ar instala procesele de autoagresiune generate de radicalii de oxigen.

Hipersensibilitatea imediată de tip reaginic, pe lângă dezavantajele mari pe care le prezintă, uneori este și utilă. Ea are un rol important în protecția organismului față de unele infecții parazitare, blocând penetrarea sau existența paraziților la nivelul mucoasei intestinale. Moleculele de IgE cu funcție de anticorpi față de unii determinanți antigenici parazitari se fixează prin fragmentul lor Fc la receptorii Fcε de pe mastocite, bazofile etc. La un nou contact cu parazitul, vor stimula eliberarea de mediatori care vor atrage granulocitele neutrofile, eozinofile etc. ce vor interveni în apărarea locală și vor acționa asupra vaselor și mușchilor netezi. Contractarea acestora, vasodilatația și umectarea excesivă a mucoaselor prin stimularea secreției de mucus accelerează eliminarea parazitului. Ca și în cazul răspunsului imun normal, și în acest gen de hipersensibilitate ar exista unele mecanisme "reglatorii". Este cazul activării sintezei de către celule a unei "substanțe de reacție lentă" (SRS = "slow reacting substances") care, după câteva ore de la declanșarea fenomenului rejecional, îl face să diminueze, rămânând doar acumularea, la locul rejecional, de celule inflamatorii (macrofage, bazofile, granulocite PMN) atrase de către factorii chemotactici eliberați în primele momente.

Acest tip de hipersensibilitate poate fi detectat prin reacția Prausnitz-Künster la om, sau prin testul de anafilaxie cutanată pasivă (PCA) la animale, un test pentru punerea în evidență a anticorpilor IgE specifici pentru un anumit antigen. Animalele sunt inoculate subcutanat cu serul în care se presupune existența IgE reaginic și apoi, cu alergenul bănuat a fi incriminat. Dacă în ser sunt molecule de IgE cu funcție de anticorp pentru acest alergen, se vor forma complexe antigen-anticorp care vor declanșa degranularea mastocitelor aflate local și fenomene alergice. Mai nou, este utilizat testul "radioalergosorbent".

Prin inoculări repetate pe cale subcutanată a unor doze mici de alergen, se realizează desensibilizarea organismului și evitarea reacțiilor alergice care, de multe ori, au sfârșit letal.

#### HIPERSENSIBILITATEA DE TIP II, MEDIATĂ PRIN ANTICORPI (CITOTOXIC - CITOLITICĂ)

Rolul major îl au moleculele IgM sau IgG cu funcție de anticorp față de unele antigene exprimate pe suprafața celulelor propriului organism. Distrugerea acestora și generarea leziunilor poate fi realizată prin trei mecanisme diferite, și anume: a) prin activarea sistemului complement; b) prin opsonizare și c) prin citotoxicitate mediată celular anticorp dependentă (fig. 209).



Anticorpii care s-au fixat specific pe suprafața celulei activează componentele complementului și formarea complexului de atac C5b6789 care va perfora membrana plasmatică provocând citoliza. Datorită formării complexelor antigen-anticorp, este activată și favorizată funcția fagocitară a macrofagelor și granulocitelor, atât prin anticorpi, cât și prin atașarea componentelor C 3b și C 3d la membrană, care vor fi recunoscute de către receptorii pentru Fc sau pentru complement de pe membrana celulelor fagocitare care însă, o dată cu vârsta, pierd receptorii pentru C 3d. De asemenea, diverse componente ale complementului acționează chemotactic asupra granulocitelor sau macrofagelor atrăgându-le la locul inflamației activându-le aderența, eliberarea radicalilor de oxigen etc., fenomene care amplifică procesele lezionale.

A treia posibilitate de lezare a celulelor este activarea funcțiilor citotoxice ale efectoarelor ADCC

care, prin receptorul pentru Fc, se atașează la fragmentul Fc al moleculelor de anticorp fixate pe celula țintă. Atașarea declanșează eliberarea de către celula efectoră a semnalelor citolitice care vor ucide ținta. Celulele efectoare ale citotoxicității mediate celular anticorp-dependentă au o capacitate diferită de liză a celulelor țintă, condiționată în special de proveniența acestora (tabelul 118).

Dintre reacțiile de hipersensibilitate de tip II, mai importante sunt hemoliza postransfuzională, reacțiile la medicamente, anemia hemolitică autoimună, trombocitopeniile, sterilitatea prin anticorpi antispermatozoizi și "boala hemolitică a nou-născutului" provocată de către incompatibilitatea Rh. În cazul hemolizei postransfuzionale, subiecții care primesc hematii străine au anticorpi naturali față de acestea, care, fixându-se pe ele, vor provoca liza dependentă de complement. Specifică omului este incompatibilitatea Rh responsabilă de boala hemolitică a nou-născutului. Unii bărbați sunt Rh D<sup>+</sup>, adică au exprimat pe suprafața celulelor lor antigenul D existent la maimuțele Rhesus, iar alții, sunt lipsiți de acest antigen, fiind Rh D<sup>-</sup>. Dacă o femeie Rh D<sup>-</sup> este fecundată de către un bărbat Rh D<sup>+</sup>, în serul ei vor apărea anticorpi anti-D care vor provoca hemoliză și grave tulburări produsului de concepție Rh D<sup>+</sup>, fenomene care pot avea sfârșit letal.

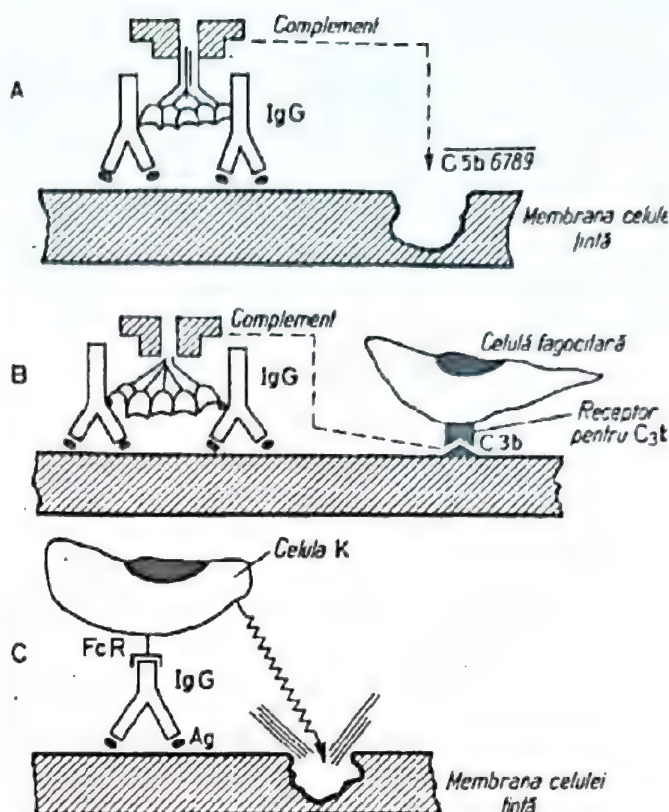


Fig.209. Modalități diferite de provocare a leziunilor tisulare în hipersensibilitatea de tip II (citotoxic-citolitică).

A. Prin activarea complexului de atac a complementului (C5b6b789).

B. Prin stimularea fagocitozei imune.

C. Prin citotoxicitate mediată celular, anticorp-dependentă (după I. Roitt și col.).



Susceptibilitatea unor celule țintă la citotoxicitatea mediată celular, realizată de către diferite tipuri de celule efectoare (după I. Roitt și col.)

Celula efectoare	Originea celulelor țintă		
	Animală	Bacteriană	Vegetală
K (efectoare a ADCC)	+++	±	?
Fagocite mononucleare	++	+++	?
Neutrofile	±	++++	?
Trombocite	±	?	?
Eozinofile	?	?	++

? = nu se cunoaște; ± = susceptibilitate redusă; ++ = susceptibile; +++ sau ++++ = susceptibilitate foarte mare.

În această situație, se pot administra profilactic anticorpi anti-Rh D care vor liza celulele Rh D<sup>+</sup> evitând astfel sensibilizarea mamei.

Anemia hemolitică autoimună este o stare patologică generată de apariția unor autoanticorpi anti-hemati proprii. Acești autoanticorpi aparțin la două tipuri funcționale diferite fiind: a) "aglutinine calde" care reacționează cu hematiile proprii, lizându-le numai la temperatura fiziologică de 37°C și b) "aglutinine reci" care reacționează numai la temperaturi sub-normale (36°C). *In vivo*, aceste aglutinine se fixează pe eritrocitele din circulația periferică unde este cea mai scăzută temperatură corporală.

Tot acestui tip de hipersensibilitate îi aparține și "sindromul GOODPASTURES" a cărui caracteristică majoră din punct de vedere clinic este disfuncția respiratorie și urinară consecutiv lezionării membranei bazale a pulmonului și rinichiului de către autoanticorpi care recunosc unele antigene exprimate pe suprafața celulelor acestor organe.

#### HIPERSENSIBILITATEA DE TIP III, MEDIATĂ PRIN COMPLEXE IMUNE

Antigenele ajunse în circulație formează cu anticorpii complexe imune care sunt eliminate fie prin fagocitoză opsonică, fie prin filtrare la nivelul rinichilor. Eliminarea antigenelor sub formă de complexe antigen-anticorp este o modalitate eficientă de epurare a structurilor străine de organism. În unele cazuri, însă, complexe se fixează pe diverse țesuturi și la nivelul endoteliilor vaselor sangvine. Prezența lor activează, prin receptorii pentru Fc, trombocitele și bazofilele care vor elibera amine vasoactive ce vor provoca creșterea permeabilității vasculare și intensificarea depunerii în continuare a complexelor. Totodată, sunt activate componentele complementului și sinteza factorilor chemotactici pentru granulocitele PMN care vor agrava leziunile instalate.

Leziunile devin evidente clinic în decurs de 3 - 6 ore de la contactul cu antigenul, de unde și denumirea de "târzie" sau "intermediară" care se dă acestui tip de hipersensibilitate, dat fiind că durata de timp necesară exprimării clinice a

fenomenului este intermediară hipersensibilităților de tip "imediat" și "întârziat". Acest tip de hipersensibilitate este rezultatul unor infecții persistente, cum este cazul malariei sau al inhalării masive a unor alergene care provoacă aglomerarea locală de anticorpi. Această înaltă încărcare cu antigene este asociată cu un răspuns ineficient în anticorpi. Spre deosebire de hipersensibilitatea de tip I unde molecula de anticorp este IgE, în cea de tip III anticorpul aparține claselor IgM și IgG necitofilici, deci care nu se fixează obligatoriu pe receptorii pentru Fc de pe celulă. Ei sunt circulanți, precipită antigenul și declanșează procese de coagulare, de extravazare leucocitară și apariția edemelor. Eliminarea lor din circulație este condiționată de dimensiunile lor, de valențele antigenului, de clasa și afinitatea anticorpilor care intră în componența complexelor precum și de cantitatea complexelor aflate în circulație. Probabil că de aceea "boala complexelor" are loc în infecții și în bolile autoimune unde sunt cantități mari de antigen.

Pe baza organelor sau a țesuturilor interesate, a naturii antigenelor și a cauzelor care au dus la apariția lor în organism, bolile provocate de către complexe imune ar putea fi încadrate în trei grupe distincte (tabelul 119).

Tabelul 119

**Grupe de boli generate de către complexe imune, în funcție de cauza favorizantă a contactului cu antigenele, de originea acestora și de locul de depozitare a complexelor antigen-anticorp**

Grupa de boli	Cauza	Originea antigenului	Locul de depozitare a complexelor imune
I	Infecții persistente	Bacteriană	Organe infectate Rinichi
II	Autoimunitate	Proprii	Rinichi Piele Articulații Artere
III	Antigene exogene	Din mediul ambiant	Pulmon

Raportul dintre moleculele de antigen circulant și cele de anticorp determină fie circulația complexelor, fie reținerea lor la nivelul țesuturilor sau organelor. În exces de antigen, complexe sunt solubile și circulante. Inițial, ele sunt în număr mic, nu se fixează, nu sunt fagocitate și sunt eliminate prin glomerulul renal.

Pe măsură ce titrul anticorpilor crește, complexe devin tot mai numeroase. În momentul în care se ajunge la un echilibru relativ între antigen și anticorp, cu menținerea unui exces moderat de antigen, complexe încep să se depună pe pereții vaselor sangvine, cu predilecție acolo unde circulația sanguină este stânjenită. Odată fixate, ele activează sistemul complement și eliberarea de histamină din bazofile și mastocite, iar acțiunea chemotactică a C3a și C5a atrage neutrofilele care vor elibera enzimele lizozomale. Acestea, asociate aminelor vasoactive eliberate de către bazofile și mastocite, vor amplifica leziunea locală și vor mări permeabilitatea vaselor. Încep să fie antrenate și trombocitele care aglutinează, formând trombuși ce vor ocluziona capilarele, le vor mări permeabilitatea și vor contribui la agravarea necrozei tisulare.



Locurile de elecție pentru depozitarea complexelor sunt rinichii, articulațiile și joncțiunea dintre derm și epiderm de la nivelul pielii. În situația în care anticorpii precipitanți sunt în exces, complexe se formează rapid, chiar la locul de inoculare a antigenului. În decurs de 3-6 ore, se dezvoltă o intensă reacție inflamatorie locală cu infiltrare celulară și activarea componentelor complementului.

Un exemplu tipic de hipersensibilitate de tip III este "boala serului", care apare în caz de exces de antigen, ca o complicație a seroterapiei. Inocularea unor doze mari de ser imun favorizează formarea de complexe consecutiv legării antigenului liber și depunerea lor la nivelul membranei bazale a glomerulului renal și pe pereții vaselor, creșterea permeabilității vasculare și, în final, activarea proceselor inflamatorii, care clinic se manifestă ca nefrite sau artrite.

"Fenomenul Arthus" este o reacție de hipersensibilitate locală, care se dezvoltă în exces de anticorpi, din care cauză procesul reacțional este situat la locul de pătrundere a antigenului. Persoanele hiperimunizate, deci cu un exces de anticorpi IgG, dezvoltă, atunci când sunt inoculate pe cale subcutanată sau intradermic cu același antigen, o reacție locală caracterizată prin apariția de edeme și de leziuni hemoragice. Acestea sunt consecința formării rapide de complexe antigen-anticorp, a depunerii lor pe pereții vaselor și declanșării infiltrațiilor cu neutrofile, bazofile, agregarea trombocitelor, activarea sistemului complement etc.

Depunerea complexelor imune și generarea acestor reacții de hipersensibilitate este condiționată printre altele de mărimea complexelor și de clasa de imunoglobuline care intră în combinație cu antigenul. Complexele mici nu se depun în țesuturi, fiind eliminate pe la nivelul rinichiului. Cele formate cu anticorpi IgG sunt mai persistente în comparație cu cele formate cu anticorpi IgM.

Clinic, alterările date de acest tip de hipersensibilitate se manifestă sub formă de artrite reumatoide, poliartrite, polimiozite, vasculite cutanate, observabile frecvent în lupusul eritematos sistemic, malarie, tripanosomiaze, endocardite bacteriene etc.

La animale, forma cea mai cunoscută de hipersensibilitate de tip III este "boala nurcii aleutine" declanșată de o infecție virală cronică, la care este susceptibilă nurca homozigotă pentru gena "aleutină" (blană de culoare deschisă). Animalele prezintă anticorpi antinucleari care produc leziuni similare lupusului eritematos sistemic al omului, poliartrită nodoasă, hepatită, vasculită, glomerulonefrită cu insuficiență renală etc. În patologia umană, reacții de hipersensibilitate de acest gen se mai întâlnesc în sindroame de genul bolii "plămânului de fermier" sau al "plămânului iubitorilor de păsări", situație în care alergenul este de natură fungică, cu referire specială la sporii de *Mycopolyspora faeni*, o actinomicetă termofilă, sau polen, puf etc.

#### HIPERSENSIBILITATEA DE TIP IV

Hipersensibilitatea de tip întârziat, "tuberculinic", sau de tip IV se deosebește de celelalte tipuri prin următoarele:

- a. Fenomenele reacționale sunt manifestate clinic tardiv, după 24 - 48 de ore sau chiar după 10 - 20 de zile de la contactul cu antigenul.
- b. Nu poate fi transmisă prin ser ci prin limfocitele T de "hipersensibilitate de tip întârziat" (Td).
- c. Leziunile sunt situate exclusiv local, la locul de inoculare a antigenului.

Limfocitele Td, sensibilizate de către un antigen, la un nou contact cu acesta eliberează limfokine care vor recruta la locul de reacție alte tipuri de celule și în special macrofage, a căror intervenție va provoca leziuni ce vor deveni vizibile după 24 - 48 de ore. La locul reacției sunt infiltrații de limfocite Td, de macrofage etc., care secretă tot mai multe limfokine și alte enzime capabile să distrugă celulele țesutului lezat și să amplifice inflamația. Modificările locale constau din alterarea inițială a permeabilității vasculare, dilatarea vaselor, urmate de infiltrarea zonei respective cu celule mononucleare. În cazul în care evenimentele au loc la nivelul pielii, aceasta se indurează și se congestionează.

De fapt, evoluția reacției de apărare spre răspuns imun normal sau spre hipersensibilitate de tip întârziat este condiționată de către o serie de factori favorizanți (tabelul 120).

Tabelul 120

**Factori dependenți și independenți de antigen care influențează orientarea reacțiilor imune spre sinteza de anticorpi sau spre sensibilitate de tip întârziat (după C.R.Parish)**

Cazuri în care stimulul induce sinteza de anticorpi	Cazuri în care stimulul induce hipersensibilitate de tip întârziat
Antigene cu conformație stabilă	Antigene nestabile conformațional
Determinanți antigenici repetitivi	Determinanți antigenici reduși numeric
Complexe antigen-anticorp în exces de antigen	Complexe antigen-anticorp în exces de anticorp
Doze moderate de antigen	Doze foarte mari sau foarte mici de antigen
Absența substanțelor imunodepresoare (ciclofosfamida)	Asocierea stimulului antigenic cu substanțe imunodepresoare

Există mai multe tipuri de hipersensibilitate de tip întârziat (tabelul 121) cu diferențe mai mult sau mai puțin semnificative între ele. De exemplu, în cazul

Tabelul 121

**Tipurile de hipersensibilitate întârziată și caracteristicile lor principale**

Tipul reacției	Jones-Mote	Contact	Tuberculinic	Granulomatos
Timpul de apariție	24 ore	24 - 48 ore	24 - 48 ore	4 săptămâni
Aspectul clinic	- Tumefacția pielii	- Eczemă	- Indurație locală, febră	- Indurația pielii
Aspectul histologic	- Infiltrații cu bazo-fil, limfocite, mononucleare	- Edem, epidermi-te - Infiltrații cu mononucleare	- Infiltrații cu limfocite și mononucleare	- Granuloame cu celule epiteloid, celule gigant, macrofage - Fibroză - Necroză
Antigenul și calea de administrare a lui	- Ovalbumină etc. - Intradermică	- Epidermică	- PPD, <i>Leishmania</i> - Dermică	- Persistența antigenului sau a complexelor antigen-anticorp în macrofage



hipersensibilității de contact sau de tip tuberculinic, leziunile devin evidente în 24-48 de ore, pe când în cazul celei granulomatoase, după 14 - 20 de zile.

**Reacțiile JONES-MOTE** (sau hipersensibilitatea cutanată "bazofilică") apar la 24 de ore după contactul cu alergenul. După cum rezultă și din denumirea ei, locul de contact cu acesta este infiltrat în special cu bazofile. Sunt reglate de către limfocitele T supresoare.

**Hipersensibilitatea de contact** este o reacție a epidermului caracterizată prin eczeme locale determinate de prezența antigenului, eczeme care dispar după eliminarea acestuia. Antigenele responsabile de acest tip de reacție pot fi molecule mari sau haptene cu greutate moleculară mică ce se cuplează cu proteinele organismului, modificându-le în așa fel încât sunt recunoscute ca străine. Este cazul dinitroclorbenzenului sau dinitrofluorbenzenului (DNCB, DNFB), al ionilor de Ni (nichel), recunoscute – atunci când sunt cuplate cu proteinele – de către celulele Langerhans care le captează și le prezintă limfocitelor T.

**Hipersensibilitatea de "tip tuberculinic"**, descrisă pentru prima dată de către R.KOCH, se instalează după inocularea intradermică, la persoanele bolnave de tuberculoză, a proteinelor derivate din mycobacterii. De asemenea, este întâlnită în infecțiile cu *Maleomyces malei* (morvă) și cu *Schistosoma mansoni*. După 24 de ore, până la 48 de ore, la locul de inoculare a tuberculinei, PPD, maleinei etc. apar o tumefacție dură și microvezicule în epiderm, provocate de către infiltrațiile cu limfocite, monocite și granulocite PMN. După 72 de ore, reacția dispare dar, uneori, poate persista timp îndelungat ca hipersensibilitate de "tip granulomatos". Spre deosebire de hipersensibilitatea de contact, unde reacția are loc la nivelul epidermului, în cea de tip tuberculinic regiunea interesată este cea subcutanată. Acest tip de hipersensibilitate are o deosebită importanță practică, fiind folosită pentru depistarea persoanelor bolnave de tuberculoză (prin testul de "intradermoreacție" sau testul Mantoux), morvă sau în unele infecții parazitare, care dau "reacții pozitive", bineînțeles cu excepția celor care prezintă "toleranță imunologică" sau imunodepresii grave.

**Hipersensibilitatea granulomatoasă** este consecința persistenței agentului patologic în interiorul macrofagelor, ca urmare a imposibilității acestor celule de a-l distruge. Rezultatul este formarea de granuloame cu celule epiteloide. Agenții cauzali sunt substanțe imunogene de origine bacteriană sau de alte proveniențe ca și substanțe neimunogene. În granulom, macrofagele fagocitează sau înconjoară agentul inductor, la rândul lor fiind înconjurate de către limfocite. La periferia formației granulomatoase sunt fibroblaste și collagen. Din fuzionarea macrofagelor cu fibroblastele rezultă celule gigant, mari, cu mai mulți nuclei, cu vezicule citoplasmice, cu reticulul endoplasmatic sărac, cu mitocondriile și lizozomii degenerați. În reacțiile de tip întârziat, rolul limfokinelor ca mesageri intercelulari este uriaș. De aceea, orice formă de stres, care duce la alterări profunde ale răspunsului imun normal, poate duce și la inhibiția sintezei limfokinelor și monokinelor, urmată de anularea acestui tip de reacție, cu rol revelator major în unele boli contagioase.

După unii ar mai exista și "tipul V" de hipersensibilitate, denumit și "tipul stimulator" în care intervin autoanticorpi care stimulează funcțional unele țesuturi proprii, ca de pildă stimularea tiroidei de către autoanticorpi care mimează hormonii tiroidieni legându-se la receptorii pentru aceștia.



## AUTOIMUNITATEA

Sistemul imun are rolul de a conserva integritatea organismului împiedicând pătrunderea sau persistența în intimitatea țesuturilor sale a tot ce este străin de el, sau apariția și proliferarea celulelor deviate neoplazice care, datorită mutațiilor survenite devin nocive pentru celulele normale. El funcționează pe baza unor reguli care impun următoarea conduită: lezarea maximă a structurilor non-proprie și minimă a celor proprii. Abaterea de la aceste reguli duce la orientarea inversă a activității sale, adică la lezarea maximă a propriilor țesuturi, la autoimunitate.

Distincția dintre propriu și străin fundamentează întregul eșafodaj de apărare imună, în sensul că efectoarele acestui sistem reacționează discriminatoriu numai față de componentele străine și le acceptă pe cele proprii. Această acceptare ar fi expresia unei inactivări totale a clonei de limfocite ("toleranță centrală") sau doar a inhibării funcționale a ei ("toleranță specifică"). Deci, abilitatea de a recunoaște și a reacționa față de structurile străine este strâns împletită cu cea de recunoaștere dar și de acceptare a celor proprii.

Așa s-ar întâmpla în "condiții normale". Dar, din cauze multiple, dintre care unele încă insuficient elucidate sau probabil chiar total ignorate în prezent, "condiția normală" se modifică, fapt care facilitează dezvoltarea de reacții imune specifice față de unii determinanți antigenici proprii. În urma acestui fapt, sunt generate procese de autoagresiune sau de autoimunitate, care "țintesc" fie determinanți antigenici ai unui singur organ, declanșând "autoimunitatea cu specificitate de organ", fie determinanți antigenici existenți la nivelul mai multor organe declanșând "autoimunitatea sistemică". În cel de al doilea caz, apar autoanticorpi care au specificitate pentru antigenele proprii larg răspândite în organism, cum ar fi de pildă în lupusul eritematos sistemic (tabelul 122).

Desigur, această clasificare este relativă deoarece există boli autoimune care ocupă "poziții intermediare" în sensul că, deși nu pot fi riguros încadrate în grupa celor sistemice sau a celor "cu specificitate de organ", se apropie de una sau alta dintre aceste situații.

Dintre bolile autoimune sistemice, bine cunoscut este "lupusul eritematos sistemic", o vasculită care afectează diverse organe cu lezarea celulelor sistemului hepatopoietic, a pielii, rinichilor etc. Sunt prezenți anticorpi anti-eritrocitari, anti-trombocitari, anti-acizi nucleici etc., care fixându-se pe celulele țintă provoacă anemie, trombocitopenie și formarea de complexe imune antigen+anticorp care se depun la nivelul diferitelor țesuturi. Boala, răspândită la om, își are corespondentul ei la șoarecii din tulpina NZW și la câine, animale la care a fost pusă în evidență existența de anticorpi anti-nucleari, anti-histone etc. Este o strică corelație între titrul acestor autoanticorpi și gravitatea bolii.

Din grupa bolilor cu specificitate de organ, trebuie menționate cele în care autoagresiunea vizează glandele endocrine, cum este cazul tiroiditei autoimune, a paratiroiditelor, pancreatitelor, sau sistemul nervos, tubul digestiv, aparatul genito-urinar, pielea, mușchii, ochii etc.

Agresiunea autoimună poate fi realizată de către anticorpi, de către diferite celule cu funcții citotoxice ca limfocitele T, NK, macrofagele, sau de către anticorpii și celulele citotoxice.

La sfârșitul secolului trecut, sub dominația conceptului de "horror autotoxicus", adică de "groază de autoagresiune" lansat de către P.EHRlich, era vehiculată ideea că nu pot exista reacții imune față de componentele organismului propriu, reacțiile imune fiind în exclusivitate destinate recunoașterii și eliminării agresorilor



Boli autoimune cu "specificitate de organ", boli "sistemice" și "situații intermediare"

Specificitatea	Boala autoimună
De organ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tiroidita Hashimoto</li> <li>- Mixedemul primar</li> <li>- Tireotoxicoza</li> <li>- Anemia pernicioasă</li> <li>- Gastrita atrofică autoimună</li> <li>- Vitiligo</li> <li>- Boala lui Addison</li> </ul>
Intermediară	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Miastenia</li> <li>- Diabetul juvenil</li> <li>- Sindromul GOODPASTURE</li> <li>- Pemfigus comun</li> <li>- Scleroza în plăci (?)</li> <li>- Anemia hemolitică autoimună</li> <li>- Purpura trombocitopenică idiopatică</li> <li>- Leucopenia idiopatică</li> <li>- Ciroza biliară primitivă</li> <li>- Sindromul Sjögren</li> </ul>
Sistemice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lupusul eritematos sistemic</li> <li>- Dermatomiozitele</li> <li>- Sclerodermia</li> <li>- Poliartrita reumatoidă</li> </ul>

străini. Dar, în anul 1900, I. MECINICOFF reușește să imunizeze cobaii cu proprii lor spermatozoizi, demonstrând că se pot forma anticorpi față de structurile organismului propriu și că acești anticorpi sunt nocivi pentru acestei structuri. După patru ani, E. DONATH și K. LANDSTEINER semnalează existența la om a unei boli autoimune apărută spontan: hemoglobinuria paroxistică "a frigore". În deceniile următoare au fost descoperite alte boli de autoagresiune. Trebuie însă menționat faptul că nu întotdeauna o reacție de autoagresiune trebuie să fie urmată de apariția unei boli, de multe ori aceste reacții fiind lipsite de o simptomatologie zgomotoasă care să poată fi sesizată clinic. Așadar, autoimunitatea poate fi "nepatogenă" și "patogenă". Cea "nepatogenă" are efecte benefice, contribuind la eliminarea autoantigenelor eliberate cu ocazia unor distrugerii celulare și tisulare sau contribuind la reglarea reacțiilor imune, cum este cazul anticorpilor anti-idiotip, al unor subpopulații de limfocite T etc.

Autoimunitatea patogenă este responsabilă de provocarea unor boli, uneori foarte grave, rezultate ca urmare a unor agresiuni autoreactive (tabelul 123).

Tabelul 123

**Boli autoimune mai des întâlnite la om**

Organele sau țesuturile	Boala
Celulele aflate în circulația sangvină	Anemia hemolitică, trombopeniile, leucopeniile autoimune, eritroblastopeniile autoimune
Țesutul conjunctiv	Lupusul eritematos sistemic, sclerodermia, poliartrita reumatoidă, dermatomiozitele, miozitele, sindromul Sjögren
Pielea	Psoriazis, dermatita herpetiformă
Glande endocrine	Tiroidita Hashimoto, boala Basedow, boala Addison idiopatică, hipoparatiroidita idiopatică, diabetul insulino-dependent, mixedemul primitiv, hipofizita autoimună
Sistemul nervos	Scleroza în plăci, polinevritele, encefalitele post-vaccinale (poliomielitice, rabică), panencefalita sclerozantă (?), demielinizările autoimune post-chirurgicale
Tubul digestiv	Boala Biermer, boala Crohn, rectocolita hemoragică, hepatite cronice non-virale, pancreatite, ciroze biliare primitive, ciroza idiopatică
Rinichi, pulmon	Glomerulonefrita, nefritele interstițiale, sindromul Goodpasture, fibroze interstițiale difuze idiopatice
Ochi	Oftalmia simpatică, cataracta senilă (?), uveo-retinite (?)
Alte organe sau țesuturi	Cardiopatiile reumatismale, miastenia, sindromul lui Dressler, crio-globulinemiile, vitiligo

Dintre bolile autoimune sistemice, fără specificitate de organ, este bine cunoscut "lupusul eritematos sistemic" (LES), o vasculită care lezează celulele sistemului hematopoietic, lezare însoțită de afectarea unor organe ca pielea, rinichii etc. La pacienții cu LES sunt prezenți în concentrații crescute autoanticorpi anti-acizii nucleici, anti-eritrocitari, trombocitari etc. Aceștia, pe lângă anemia și trombocitopenia pe care o realizează, formează și complexe antigen-anticorp care se depun la nivelul diferitelor țesuturi și organe. Boala este răspândită la om, având corespondent și la câine și unele tulpini de șoarece (NZW.) Între titrul autoanticorpilor și severitatea bolii este o corelație semnificativă.

Spondilitele ankilozante, artritele reumatoide, sclerodermiile, bolile de collagen etc. sunt boli autoimune fără specificitate de organ.

Dintre cele cu specificitate de organ, bine cunoscute sunt tiroidita autoimună, paratiroiditele, pancreatitele, boli ale pielii, mușchilor, tubului digestiv etc.

Reacțiile autoimune pot fi realizate și experimental, prin inocularea de diferite antigene, de regulă asociate cu adjuvantul Freund complet, care induce fie sinteza de anticorpi, fie proliferarea de clone autoreactive de limfocite T și declanșarea unor boli de autoagresiune dintre care multe au corespondent cu unele boli



autoimune umane (tabelul 124). De fapt, cunoștințele noastre referitoare la unele procese autoimune generate de limfocitele *T* au fost obținute prin modelul encefalitei alergice experimentale (EAE), o demielinizare inflamatorie similară sclerozei multiple umane. EAE poate fi indusă prin imunizarea animalelor cu "proteina mielinică de bază" (MBP) sau cu proteolipide (PLP). Așa s-a dovedit că în cursul instalării autoimunității există o reacție dinamică în cursul căreia sunt antrenate secvențial diferite populații de limfocite *T*. La șoarece, de pildă, imediat după inocularea MBP se declanșează răspuns imun față de secvența peptidică 1-11, după care sunt antrenate și clonele de celule care recunosc determinanții 35-47, 81-100, 121-140, chiar dacă imunizarea a fost făcută numai cu secvența 1-11. Ar fi o "recrutare" a unui repertoriu reacțional generat de către un stimul unic, care va duce la progresia bolii prin recrutarea de limfocite *T* cu alte specificități de recunoaștere.

Tabelul 124

## Boli autoimune care pot fi induse experimental

Boala	Agentul imunizant	Correspondentul la om
Orhita	Spermatozoizii autologi	Sterilitatea masculină
Tiroidita	Tireoglobulina Celule tiroidiene	Tiroidita Hashimoto
Inflamații ale corticosuprarenalei	Celule corticale	Boala Addison
Poliradiculonevrită	Mielina din SNP	Sindromul Guillain-Barré
Encefalomielita alergică	Mielina SNC Peptide encefalitogene	EA acută, după vaccinarea antirabică EA recidivantă (scleroza în plăci)
Hepatita cronică	Antigenele de pe suprafața hepatocitelor	Hepatita cronică activă autoimună
Glomerulonefrita prin autoan- ticorpi anti-membrana bazală	Intoxicații cu mercur Antigenele de pe membrana bazală	Sindromul Goodpasture Glomerulonefrita autoimună
Anemia hemolitică murină	Hematii de șobolan Hematii de șoarece modificate prin încălzire	Anemia hemolitică autoimună
Uveoretinite	Glicoproteina IRBP Rodopsina (un pigment)	Uveoretinite
Poliartrite	Adjuvant Freund complet Proteoglicani Colagen II	Poliartrită reumatoidă

EA=encefalomielita alergică; IRBP=Interphotoreceptor Retinoidbinding Protein, o proteină de 140 kD care leagă retinoizii fotoreceptorilor; SNC= sistemul nervos central; SNP= sistemul nervos periferic.

Realizarea experimentală a proceselor autoimune nu este obligatoriu asociată cu manifestarea clinică a bolii. Acest fapt demonstrează că și la oameni pot exista procese de autoagresiune care nu sunt exprimate clinic și, deci, că nu există o toleranță absolută a sistemului imun față de antigenele proprii organismului. Ca atare, se poate afirma că toleranța imunologică explicată prin existența unei "deleții clonale", a absenței totale a clonelor de celule care pot recunoaște structurile organismului propriu, nu este absolută. De altfel, este tot mai acceptată ideea că limfocitele "autoreactive" sunt o componentă a repertoriului sistemului imun, dar numai o mică parte dintre ele pot deveni celule efectoare ale proceselor patologice. În cazul unor antigene, toleranța poate fi dată de lipsa clonei de limfocite, pe când în cazul altora, lipsa răspunsului imun ar fi expresia unei supresii active sau consecința "sechestrării" unor antigene.

Autoantigenele ar putea fi încadrate, din punct de vedere al accesibilității lor față de acțiunea sistemului imun, în două categorii distincte: *a)* autoantigene "sechestrate", deci inaccesibile și *b)* autoantigene "protejate" de bariere anatomice sau chimice care sunt oarecum accesibile efectorilor imunității. Din primul grup pot fi amintiți spermatozoizii, iar din cel de al doilea grup, mielina, antigenele ochiului, unele antigene intracelulare etc.

Răspunsul imun față de antigenele proprii, nesechestrate, este condiționat printre altele și de nivelul lor în circulație: atunci când sunt în cantități mari, cum este cazul albuminei serice, reactivitatea față de ele este totală, supresia acționând atât asupra celulelor *B* cât și asupra celor *T*; dacă, însă, concentrația autoantigenelor este redusă, ca de pildă în cazul tireoglobulinei, atunci toleranța este parțială și se manifestă la nivelul limfocitelor *T*. Creșterea nivelului seric, în acest caz, generează sinteza de autoanticorpi.

Pot declanșa sinteza de anticorpi antigenele proprii modificate, cum este cazul cuplării proteinelor organismului cu unele haptene străine, sau asocierea lor la adjuvantul Freund complet. De exemplu, cuplarea arsenului la tireoglobulină o poate face imunogenă pentru propriul organism.

Pot apărea anticorpi și după stimulări cu antigene care au epitopi comuni cu unii determinanți antigenici existenți la nivelul celulelor proprii. De exemplu, stimulul antigenic cu streptococi patogeni poate declanșa endocardita autoimună datorită înruderii antigenice existente între celulele endocardului și streptococii beta-hemolitici.

Și imunizarea cu antigene heterologe poate avea efecte similare. Este cazul inoculărilor cu tireoglobulină heterologă urmată de formarea de anticorpi anti-tireoglobulină proprie și, implicit, de tiroidită autoimună.

Mecanismele care stau la baza declanșării reacțiilor autoagresive nu sunt perfect cunoscute. În linii generale, ar fi vorba de un gen de "scurt circuit" funcțional al limfocitelor *T* care ar fi derepresate, devenind autoreactive. Această situație poate avea loc atunci când se fac imunizări cu antigene cu determinanți comuni celor ai țesuturilor proprii etc. Au fost emise diferite ipoteze care încearcă explicarea lor, dar nici una dintre ele nu aduce dovezi experimentale pentru a fi acceptată fără rezerve.

Cele mai cunoscute ipoteze sunt următoarele:

*a. Teoria antigenului sechestrat*, conform căreia unele antigene, cum ar fi cele ale sistemului nervos, ale cristalinului, tiroidei, spermatozoizilor etc., sunt "sechestrate" de către bariere anatomice și, ca atare, nu au fost "inventariate" de către celulele sistemului imun în cursul dezvoltării embrionare a organismului, din care cauză acesta nu le recunoaște ca fiind ale lui. Ele rămân izolate și inaccesibile recunoașterii imune, până când bariera anatomică este înlăturată accidental, ca



de pildă în cazul unor intervenții chirurgicale pe creier când, prin secționarea unor filete nervoase, mielina care era "sechestrată" ajunge în exteriorul nervului și pătrunde în circulație. În această situație, limfocitele "descoperă" prezența lor și le tratează ca pe niște molecule "străine", dezvoltând reacții imune. Această ipoteză încearcă să explice și menținerea grefei fetale în timpul sarcinii deși, după cum se știe, fetusul nu este total izolat de sistemul imun al organismului matern, în acest proces de acceptare a antigenelor străine intervenind un complex de factori.

b. *Teoria clonei interzise* susține că, prin mutații somatice, ar apărea clone de celule limfoide cu receptori pentru unele antigene proprii organismului, clone care în mod normal sunt distruse în cursul maturării lor în organele limfoide primare prin "selecții pozitive și negative". Dacă aceste clone nu sunt eliminate la timp, atunci vor reacționa față de antigenele organismului, generând reacții de auto-agresiune față de propriile țesuturi sau organe.

c. *Teoria deficitului imun* afirmă că în etiologia agresiunii autoimune ar interveni deficite imune care inhibă funcțiile limfocitelor *T* supresoare și ale altor celule cu rol imunoreglator. În acest fel, unele clone de celule efectoare "scapă" de sub control și devin reactive față de structurile propriului organism. Conform acestei teorii, alterarea circuitelor reglatoare și inhibarea funcțională sau scăderea numărului de celule *T* supresoare ar fi cauza bolilor autoimune.

Probabil că toate acestea sunt valabile pentru una sau alta dintre bolile autoimune declanșate accidental sau experimental.

În orice caz, limfocitele pot deveni autoreactive în condițiile în care:

- a) scapă de selecția negativă și pozitivă din timus (deleție clonală);
- b) nu primesc semnale supresoare de la citokine;
- c) nu primesc semnale inductoare de anergie;
- d) nu sunt blocate de celule supresoare;
- e) exprimă activ molecule de adeziune.

Este cert că un rol important în declanșarea, întreținerea și cronicizarea bolilor autoimune revine limfocitelor *T*. În sprijinul acestei informații stă existența – la pacienții cu astfel de boli – de limfocite autoreactive, al căror transfer la subiecții normali poate duce la apariția reacțiilor de autoagresiune. Experimental se poate transfera prin limfocitele *T* autoreactive encefalomielite alergică de la un animal sensibilizat la altul sănătos.

Cu ajutorul tehnicii "reacției polimerazice" (PCR = polymerase chain reaction), a fost analizată structura receptorilor pentru antigen de la nivelul limfocitelor *T* infiltrate în procesele inflamatorii locale. Așa s-a constatat că aceste celule sunt activate într-o manieră antigen-specifică, exprimând gene *V* selective care diferă de cele exprimate în mod normal de către celulele aflate în circulație sau în organele nelezionate. Deci, este o dovadă a existenței unei proliferări clonale cu potențial de recunoaștere specific pentru unele antigene, respectiv pentru antigenele proprii ale organismului.

În unele boli, ca de exemplu în sindromul tireotoxic GRAVES, limfocitele exprimă intens receptori pentru IL-2, fapt care ar sugera un posibil rol al acestora în generarea sau reglarea unor procese autoreactive. În altele (lupus eritematos sistemic, artrita reumatoidă, sindromul Sjögren etc.) se înregistrează un nivel scăzut al inductorilor de celule supresoare ( $CD45R^+$ ) și o alterare a sintezei de IL-2 de către aceste celule. Toate acestea dovedesc existența unor mecanisme multiple care intervin în acest proces atât de complex.

Dar, indiferent dacă este vorba de activarea potențialului de recunoaștere a antigenului prin receptori pentru antigen sau de activarea exprimării receptorilor



pentru IL-2 care să ducă la "trezirea" clonelor de limfocite "interzise", aflate în stare de "letargie funcțională", mecanismul de bază care declanșează în faza inițială această "trezire" este același și, prin manipularea lui, se încearcă în prezent găsirea unor mijloace de influențare a proceselor autoimune.

Este bine cunoscut faptul că activarea specifică a limfocitelor T este rezultatul unui complex de reacții care constau din prelucrarea peptidelor-antigen de către celulele antigen-prezentatoare și asocierea lor la moleculele MHC de clasa I sau II. Momentele principale în acest proces sunt:

- a) liza antigenului fagocitat, cu conservarea intactă a epitopilor;
- b) legarea peptidei-epitop la moleculele MHC -octomeri sau nanomeri atunci când se leagă la moleculele MHC de clasa I și mai mari decât nanomeri atunci când se leagă la moleculele de clasa II;
- c) exprimarea complexelor peptidă-MHC pe suprafața celulelor antigen-prezentatoare;
- d) prezentarea, de către aceste celule a complexelor, receptorilor pentru antigen de pe membrana limfocitelor T.

Asocierea peptidelor proprii la situsul de pe MHC poate declanșa reacțiile autoimune. Supresia acestora poate fi realizată, deocamdată mai mult teoretic, prin blocarea acestui situs de pe MHC prin alte peptide care să competiționeze cu cele declanșatoare ale răspunsului autoimun, prin neutralizarea moleculelor MHC cu anticorpi care vor bloca situsurile de legare ale peptidelor, prin blocarea moleculelor CD4 din componența receptorilor pentru antigen de pe limfocitele T etc. (fig. 210). Unele rezultate experimentale obținute până în prezent sunt încurajatoare. De exemplu, s-a reușit evitarea inducerii encefalomielitei experimentale alergice prin administrarea de cantități mari de peptide sintetice, asemănătoare dar diferite de epitopul dominant al proteinei mielinice de bază (MBP) responsabil de declanșarea bolii. Succese similare au fost obținute prin inocularea de complexe solubile formate din peptidele autoantigene legate la moleculele MHC sau chiar prin realizarea "toleranței de zonă înaltă", adică prin inocularea masivă de doze mari din antigenul incriminat.

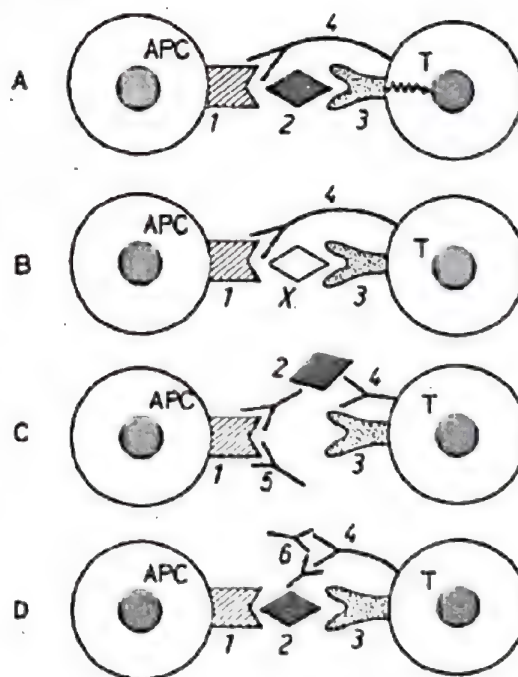


Fig.210. Diferite modalități posibile de blocare a reacțiilor autoimune.

A. Celulele prezentatoare de antigen (APC) recunosc peptida antigenică (2) asociată la moleculele MHC proprii (1). Limfocitul T (T) recunoaște prin receptorul pentru antigen (3) complexul peptidă stimulantă + MHC (1+2), proces în care un rol activ au și moleculele CD4(4).

B. Substituirea peptidei antigen (2) cu alta (X) blochează posibilitatea de activare a limfocitului T.

C. Anticorpii anti-MHC (5) competiționează cu peptida antigen (2) pentru situsul de pe MHC și, în consecință, blochează activarea celulei T.

D. Anticorpii anti-CD4 (6) anulează contactul dintre celula APC și limfocitul T, ajungându-se la imposibilitatea activării policlonale sau monoclonale a celulelor T.



Majoritatea procedurilor de blocare a reacțiilor autoimune se bazează pe conceptul de inactivare funcțională a limfocitelor *T*, inactivare care s-ar realiza prin diferite modalități ca: a) "deleția clonală" adică eliminarea ireversibilă a clonei de celule *T* care ar recunoaște antigenul propriu, prin omorârea ei în cursul maturării intratimice; b) prin reducerea potențialului funcțional al clonei autoreactive, cu menținerea ei în limitele cele mai reduse sub raportul capacității de recunoaștere și reacție și c) prin blocarea funcțională a ei cu ajutorul mecanismelor supresoare realizate, în special de către limfocitele *T* supresoare. În cazul deleției clonale, este vorba de absența totală a limfocitelor *T* autoreactive, iar în celelalte două cazuri de prezența "tăcută", nefuncțională a acestor limfocite.

După cum menționam anterior, posibilitățile de inducere a imunosupresiei în vederea blocării reacțiilor autoimune ar fi, în afară de "deleția clonală", blocarea situsurilor de legare a peptidelor de la nivelul MHC, blocarea MHC sau a *CD4* cu anticorpi, inducerea toleranței de "zonă înaltă" prin inocularea de doze masive de antigen și activarea mecanismelor supresoare ale organismului.

Agenții imunosupresori cei mai utilizați în prezent se limitează de fapt la cinci medicamente (tabelul 125), fiecare dintre ele având alt mod de acțiune.

Tabelul 125

**Agenții imunosupresori utilizați în terapia bolilor autoimune  
și principalele "ținte" asupra cărora acționează**

Medicamentul	Țintele asupra cărora acționează
Steroizii	- Macrofagele, limfocitele <i>T</i> , limfocitele <i>B</i>
Azatioprina	- Limfocitele <i>T</i>
Ciclofosfamida	- Limfocitele <i>B</i>
Ciclosporina A (CsA)	- Limfocitele <i>T</i>
Metotrexat	- Limfocitele <i>T</i> , <i>B</i>

Din păcate, toți acești agenți, în cazul administrărilor prelungite, au unele efecte nedorite sau chiar profund dăunătoare care le limitează utilizarea. De pildă, CsA este nefrotoxică, ciclofosfamida provoacă leucopenie etc. În general, terapia în stadiile inițiale ale bolii este mai eficace decât în cele tardive. În multe cazuri, după terapie se înregistrează vindecări pentru un timp limitat urmate de re izbucnirea manifestărilor clinice. De regulă, bolile mediate de către autoanticorpi beneficiază de terapia cu ciclofosfamidă, iar cele mediate de către limfocitele *T* autoreactive de terapia cu CsA (tabelul 126).

Plecându-se de la conceptele imunologice în terapie, se încearcă introducerea în arsenalul terapeutic a unor mijloace științifice raționale. Este cazul anticorpilor monoclonali anti-*CD4* de la nivelul receptorului pentru antigen al limfocitelor *T*, al anticorpilor anti-MHC de la nivelul celulelor APC sau al anticorpilor anti-*CD3*, utilizați atât pentru realizarea toleranței la alogrefe, cât și pentru combaterea unor reacții autoimune. Se mai folosesc diferite citokine sau anticorpi anti-citokine, ca de pildă anticorpi anti-IL-2 sau anti-receptorii pentru IL-2, conjugate de toxine cu anticorpi anti-*CD2*, -*CD3*, anti-LFA-1 etc. De exemplu, anticorpii anti-*CD4* ar da rezultate bune în terapia lupusului eritematos sistemic, a artritei reumatoide, encefalitei alergice, diabetului insulino-dependent etc. Recent, se încearcă introducerea în arsenalul terapeutic a ciclosporinei A și a unor competitori peptidici

Tabelul 126

Sensibilitatea unor boli autoimune mediate de autoanticorpi sau limfocite T la agenții imunosupresori (după J.F.Bach)

Boli mediate de către	Sensibilitate la	
	Ciclofosfamida	Ciclosporina A
<i>Autoanticorpi</i>		
Lupusul eritematos sistemic	++	+
Sindromul Goodpasture	++	±
Granulomatoza lui Wegener	++	±
Pemfigus	+	?
<i>Limfocite T</i>		
Diabetul insulino-dependent	?	++
Uveita	±	++
Psoriazis*	?	++

\* Se pare că doza optimă de CsA în psoriazis este de 3 mg/kg/zi.

peptidici solubili pentru antigenele MHC care, legându-se la antigenele MHC de clasa I sau II, blochează peptidele imunogene autoreactive întrerupând instalarea lanțului reacțional imun. De asemenea, speranțe mari se pun în anticorpii anti-idiotip prin care s-ar putea neutraliza situsurile combinate de înaltă specificitate de la nivelul regiunilor V ale receptorilor pentru antigen.

Este adevărat că unele medicamente, diverse substanțe de origine animală sau vegetală, unele bacterii sau virusuri pot avea determinanți antigenici comuni sau asemănători cu cei ai organismului și că reacțiile care vizează neutralizarea acestora pot deveni nocive pentru organism. Dar nu sunt de neglijat nici factorii genetici, multe boli fiind asociate unor gene sau grupe de gene care controlează sinteza unor antigene MHC, cum este cazul unor relații dintre antigenele sistemului HLA și unele boli autoimune la om, al caracterelor genetice ale șoarecilor NZW care fac boala lupică etc. De exemplu, în spondilita ankilozantă este o frecvență crescută a antigenelor HLA-B27, în scleroza multiplă a HLA-B8, în psoriazis a HLA-B13 etc. În sfârșit, pot interveni și alți factori. Se afirmă de pildă că IL-2 secretată în exces de către limfocitele T activate ar contribui la distrugerea organelor țintă, dozele mari de IL-2 favorizând dereglarea sistemelor de control ale reacțiilor imune.

Dar oare procesul de autodistrugere se rezumă numai la mecanismele înalt specifice, realizate de către clonele de limfocite T sau B autoreactive? În procesele de lezare a unor organe sau țesuturi, în afără de limfocite pot interveni și celulele NK, macrofagele, mastocitele și chiar granulocitele PMN. Astfel, în artrita reumatoidă este o hiperactivitate a limfocitelor B, cu sinteza activă de imunoglobuline din clasele IgG, IgM și IgE, în special în fazele timpurii ale bolii. În general, activarea policlonală a limfocitelor B poate duce la hiperproducție de anticorpi și la formarea de complexe imune. În sindromul Sjögren, caracterizat prin modificări inflamatorii ale glandelor exocrine, sunt infiltrări ale acestor glande cu monocite care pot avea un rol important în progresia bolii. În scleroza multiplă și în *Lichen planus*, o boală inflamatorie cronică cu etiologie necunoscută, activitatea



citotoxică a celulelor NK este scăzută, de unde probabil și capacitatea redusă a organismului de distrugere a unor celule efectoare a agresiunii. În lupusul eritematos sistemic și în scleroza multiplă, sunt anomalii funcționale ale granulocitelor PMN manifestate printre altele printr-o eliberare mare de molecule toxice de oxigen. De aceea, poate că "autoimunitatea" ar trebui încadrată în grupa mare a proceselor patologice de "autoagresiune", rezultantă a dereglărilor survenite fie la nivelul unor populații de celule efectoare, fie în procesele de instalare și menținere în limite normale a cooperărilor celulare și a mecanismelor de control ale funcțiilor lor.

Autoimunitatea nu este în fond altceva decât o reacție imună realizată pe principiile răspunsului imun și cu mijloacele specifice acestuia, dar orientate spre "ținte" care aparțin propriului organism. Dar și reacțiile de hipersensibilitate, de exemplu, recunosc aceleași mecanisme efectoare ca și răspunsul imun normal, cu singura deosebire că se desfășoară la alte grade de intensitate.

Ce deosebire fundamentală există de pildă între poliartrita reumatoidă, o boală autoimună sistemică, și astmul bronșic infecțios, o boală alergică? Și într-un caz și în celălalt, se instalează leziuni tisulare provocate de către celulele citotoxice T dar și de către granulocitele PMN activate, care nu-și mai pot controla riguros potențialul lor de eliberare a moleculelor de oxigen toxic, "arzând" atât celulele distruse cât și pe cele normale, amplificând în felul acesta procesul lezional. Exemplele ar putea continua, de unde concluzia că "granițele" între normal și patologic, pe de o parte, și între diferitele manifestări clinice ale "patologicului", pe de altă parte, sunt relative. De aceea, singura noastră cale de a înțelege și manipula procesele biologice, pe care le etichetăm poate că nu întotdeauna foarte justificat drept normale sau patologice, este studiarea lor și încercarea de descifrare în profunzime a mecanismelor care le generează.

## MODULAREA NESPECIFICĂ A RĂSPUNSULUI IMUN

Rezultatele cercetărilor experimentale din ultimele trei-patru decenii au demonstrat fără echivoc faptul că recunoașterea și eliminarea specifică a structurilor străine de organism se face într-o manieră înalt specifică. Elementele care efectuează această recunoaștere și eliminare, respectiv efectorii funcțiilor imune sunt alcătuiți din diferite populații de celule sau molecule care acționează specific sau nespecific. Astfel, efectorii limfocitari și imunoglobulinici recunosc specific determinanții antigenici: în cazul limfocitelor prin intermediul receptorilor de membrană pentru antigene, iar în cazul imunoglobulinelor prin "situsurile combinate" de la extremitățile  $\text{NH}_2$  terminale ale moleculei.

Acum nimeni nu mai pune la îndoială temeinicia teroriilor selective asupra răspunsului imun: determinantul antigenic selectează în exclusivitate clona celulară cu receptori specifici, predestinată să-l recunoască și să-l neutralizeze numai pe el din tot arsenalul de determinanți antigenici existenți în natură.

Pe baza specificității, această caracteristică majoră a reacțiilor imune, au fost și sunt folosite, în scop terapeutic sau profilactic, diferite instrumente de luptă de genul serurilor imune, vaccinurilor, liniilor celulare, anticorpilor monoclonali etc., care au permis combaterea multor boli infecto-contagioase și cu ajutorul cărora se speră să se poată interveni eficient în unele stări de autoagresiune, în deficite imune etc. Se poate afirma că, în momentul de față, infecțiile bacteriene și cele parazitare pot fi bine stăpânite și relativ ușor controlate. Practicienii și clinicienii pot preveni bolile contagioase și pot trata infecțiile bacteriene cu ajutorul antibioticelor. Chiar și infecțiile parazitare pot fi tratate cu ajutorul diverselor substanțe antiparazitare.

Cu totul altfel se pune problema în cazul unor infecții virale și în special în cazul bolilor neoplazice, indiferent dacă acestea din urmă sunt induse de virusuri oncogene sau recunosc etiologii nevirale. În ciuda eforturilor depuse de-a lungul anilor, terapia unor infecții virale cum ar fi sindromul de imunodeficit dobândit AIDS și a proceselor maligne nu a înregistrat progrese vrednice de menționat.

Dar, observațiile experimentale și clinice au demonstrat că, în afară de reacțiile specifice și care antrenează o clonă limfocitară unică sau un număr restrâns de clone, elementele sistemului limfoid pot fi activate și nespecific sau "policlonal", situație în care sunt implicate aproape toate clonele celulare. Astfel activate, ele devin mai eficiente în protejarea organismului față de o gamă largă de agresori. Acest proces, în care sunt antrenate nespecific un mare număr de clone celulare care ating parametrii optimi de funcționare, se numește "modulare nespecifică a răspunsului imun" sau "imunomodulare", iar agenții care-l generează sunt cunoscuți sub denumirile sinonime de "imunomodulatori", "imunoactivatori",



"imunorestoratori", "modificatori ai răspunsului biologic (BRM = "biological response modifiers") etc.

Imunomodulatorii au o sferă largă de aplicabilitate în terapia sau profilaxia unor boli cronice, ei realizând readucerea funcțiilor imune ale organismului în limite normale sau, altfel spus, contribuind la menținerea homeostaziei acestuia și la terapia unor boli cronice (tabelul 127).

Tabelul 127

Unele boli care beneficiază de terapia imunomodulatoare (după J.W.Haden)

Agentul imunomodulator	Țara	Caractere chimice, sursă	Utilizare clinică
<b>Activatori ai macrofagelor</b>			
Picibanil	Japonia	Extract din <i>Streptococcus pyogenes</i>	Cancer
BCG	USA, țările Europei	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (BCG)	Cancer al vezicii urinare
Krestin	Japonia	Polizaharid fungic	Cancer gastric și cu alte localizări
Lentinan	Japonia	Polizaharid fungic	Idem
Biostim	Europa	Extract din <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Infecții cronice
Bronho-Vaxom	Europa	Extract din opt bacterii	Idem
<b>Activatori ai celulelor T</b>			
Timostimulina	Europa	Extract peptidic timic	Cancer și infecții cronice
T-activin	Rusia	Idem	Idem
Thym-Uvocal	Germania	Idem	Idem
Thymomodulin	Italia	Idem	Idem
<b>Alți activatori</b>			
Romurtide	Japonia	(Lys <sup>18</sup> ) muramyl-dipeptid	Regenerarea măduvei osoase
Thymopentin TP-5	Italia și Germania	- Pentapeptid	Artrita reumatoidă, infecții, cancer
Levamisol	USA, Ungaria	- Phenylimido-thiazole	Cancer
Inosine pranobex	Europa	- Complex de săruri ale inosinei	Infecții cronice
Poly AU	Franța	- Polinucleotid dublu catenar al acizilor adenilic și uradilic	Cancer al sânului

Conceptul practic și teoretic de stimulare nespecifică a răspunsului imun a fost generat de numeroase observații empirice referitoare la efectul binefactor asupra organismului exercitat de către unele substanțe organice sau anorganice. Multe metode terapeutice empirice, bazate pe stimularea nespecifică a mijloacelor de apărare imună sau neimună a organismului, se practică și astăzi cu succes,

demonstrându-și în acest fel valabilitatea. Este cazul terapiei revulsive care folosea și mai folosește badijonarea cu tinctură de iod, alcool sau cu diverse alte iritante și care, datorită vasodilatației și afluxului leucocitar provocat, au efecte salutare în afecțiuni "a frigore" sau de altă natură. Tot în acest context pot fi amintite autohemoterapia, ventuzele constituind o formă comodă și simplă de aplicare a ei, galactoterapia etc. Un pas înainte, atât în ce privește îmbogățirea arsenalului de mijloace terapeutice, cât și sub raportul dezvoltării cunoștințelor imunologice, îl reprezintă descoperirea și introducerea în clinică a terapiei imunomodulatoare.

## RELATIA INFECȚIE – IMUNOMODULARE

Imunostimularea nespecifică, cauzată de diverse procese infecțioase, a fost remarcată de multă vreme. În ultimii 250 de ani, a fost semnalată în repetate rânduri influența benefică a infecțiilor și inflamațiilor sau febrei provocate de către acestea. Încă înainte de anul 1744, SCHWENKE (citată de N.C. NAUTS) descria efectul unui banal abces asupra evoluției unei tumori mamare. Un carcinom mamar, cu prognostic și evoluție foarte gravă, a început să regreseze în momentul apariției accidentale a unui abces localizat la un picior. Pe măsură ce abcesul și supurația se accentuau, tumora regresa, ajungându-se în cele din urmă la dispariția ei totală. După vindecarea abcesului, însă, ea a reapărut, pentru ca să dispară din nou în urma provocării voite a unui alt abces. Ulterior, numeroase publicații au semnalat antagonisme între diferite forme de cancer și tuberculoză, sifilis, infecții stafilococice, streptococice etc. Pe baza acestor observații a fost lansată ipoteza conform căreia o cauză majoră a creșterii actuale a incidenței bolilor neoplazice ar constitui-o succesele obținute în combaterea bolilor infecțioase. Într-adevăr, unele statistici sugerează de exemplu că, pe măsură ce scade numărul cazurilor de tuberculoză sau de viroze pulmonare, crește incidența cancerului pulmonar (fig. 211). Determinându-se frecvența cancerului și a diferi-

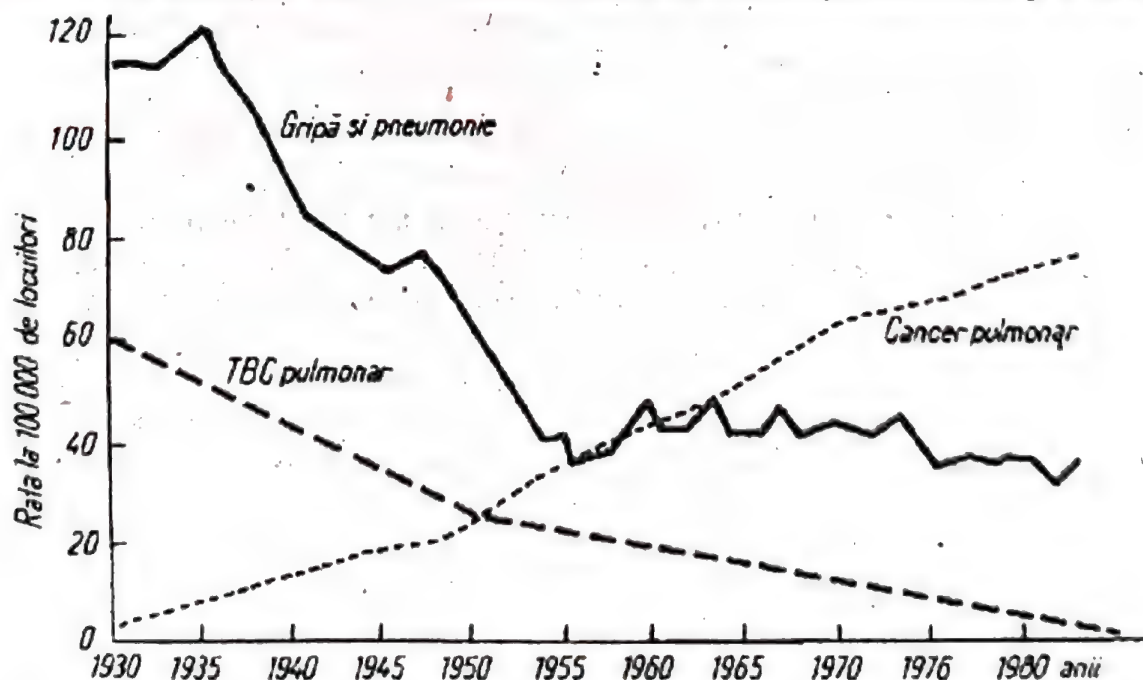


Fig. 211. Cauza deceselor la bărbații din S.U.A. între anii 1930-1980.

A fost înregistrată o relație inversă între rata mortalității provocată de TBC, pneumonii cu etiologia virală sau bacterială și cea cu etiologie neoplazică care a înregistrat o creștere continuă (după H. Nauts).



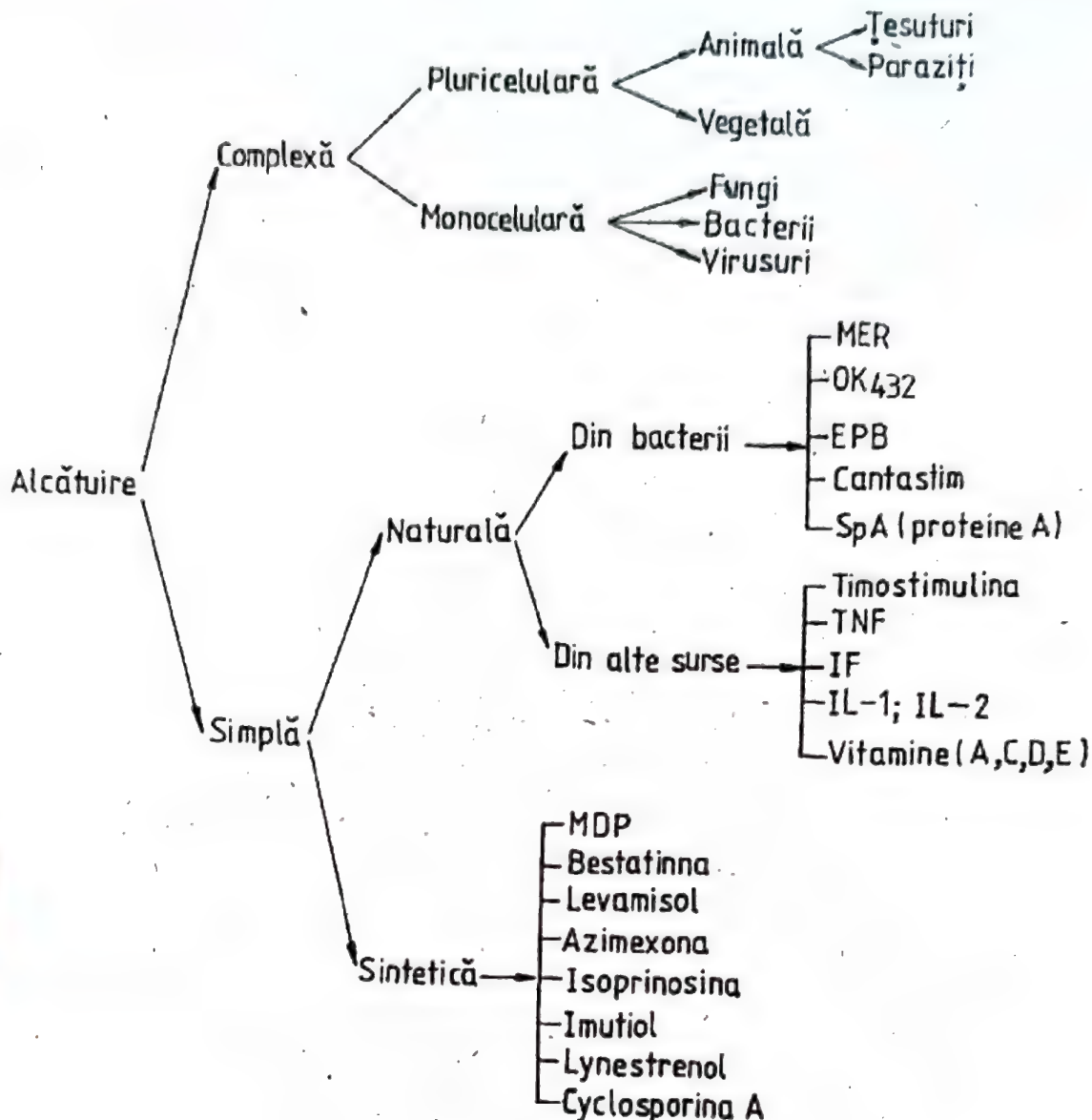
telor infecții în rândul populațiilor albă și de culoare din SUA și Canada, populații diferite între ele prin nivelul de trai, s-a constatat că la indieni, în comparație cu albi, mortalitatea datorită cancerului este semnificativ mai redusă, în timp ce frecvența infecțiilor banale sau a bolilor infecto-contagioase este de șase ori mai mare decât la albi. La pacienții din unele țări subdezvoltate din Africa, melanoamele, cunoscute pentru capacitatea lor de metastazare și agresivitatea lor, nu metastazează chiar dacă tumora primară se dezvoltă intensiv. De regulă, acești pacienți au boli parazitare sau diverse abcese localizate în diferite regiuni ale corpului și în special la picioare. Observații de acest gen au condus la ideea că incidența crescută a cancerului înregistrată în ultimele decenii, în special în țările dezvoltate sub raport economic, s-ar datora folosirii pe scară largă a antibioticelor care, sterilizând organismul, îl fac să nu mai fie nevoit să-și folosească mijloacele de apărare imună normale, mijloace care au fost dobândite și perfecționate în decursul a milioane de ani de evoluție. Poate că aceste afirmații sunt exagerate dar, în mod sigur, conțin un sămbure de adevăr. Cert este că datele epidemiologice din ultimii 50 de ani arată că, în țările dezvoltate, incidența bolilor contagioase și a diverselor forme de infecții banale a scăzut datorită unui mai bun control al lor prin intermediul vaccinurilor, serurilor imune specifice sau al antibioticelor, pe când cel al bolilor neoplazice a crescut. Poate din această cauză, tot în acest țări, s-a intensificat cercetarea și aplicarea practică a imunomodulatorilor nespecfici, SUA inițiind chiar un program complex și foarte costisitor de cercetare în acest domeniu, cunoscut sub denumirea de "Program BRM" (Biological Response Modifiers).

Toți "modificatorii răspunsului biologic" sunt agenți care modifică relația dintre organismul gazdă și agresorul de natură infecțioasă sau neoplazică, modificând în favoarea gazdei întregul proces biologic care se instalează în astfel de relații. Majoritatea acestor "modificatori" sunt "imunomodulatori", agenți chimici sau biologici care activează funcțiile imune atunci când sunt deprimare, sau le deprimă atunci când funcționează intens. Terapia cu astfel de agenți se numește "imunoterapie", ea realizând modificări salutare ale mecanismelor de rezistență imună, care devin mult mai eficiente în controlul multiplicării germenilor, formării tumorilor primare sau metastazării lor.

Acționează ca imunomodulatori celule eukariote întregi, fragmente de perete sau de membrane celulare, celule prokariote, molecule simple, molecule care nu sunt produse sau sunt produse în mod normal de către organism etc. (tabelul 128). Ei sunt folosiți fie sub formă de celule întregi, în special ca bacterii inactivate, fie sub formă de fragmente celulare, cum ar fi de pildă scheletul peretelui celular sau ribozomii, sau chiar ca simple molecule obținute prin diferite procedee chimice direct din sursele naturale, sau sintetizate artificial. De altfel, în ultimii 20 de ani, s-a trecut de la utilizarea în practică a corpurilor bacterieni sau extractelor bacteriene, la strategii de producere a lor mai sofisticate, folosindu-se o selecție largă de compuși activi din punct de vedere imunofarmacologic, cu diverse acțiuni asupra sistemului imun. Multe dintre aceste preparate sunt utilizate nu numai pentru proprietățile lor imunomodulatoare, dar și ca adjuvanți ai răspunsului imun, cu aplicabilitate practică în stimularea sintezei anticorpilor în cursul imunizărilor pentru obținerea de seruri hiperimune.

Deci, imunomodulatorii au o structură simplă (moleculară) sau complexă (tisulară sau celulară), pot proveni din surse naturale sau din sinteză, fiind obținuți ca produși biologici de origine virală, bacteriană, fungică, vegetală sau animală, sau ca produși chimici.

## Originea și complexitatea structurală a unor imunomodulatori



## IMUNOMODULATORI NATURALI, DE ORIGINE BIOLOGICĂ

## Bacterii utilizate ca imunomodulatori

W.B. COLEY poate fi considerat pionierul terapiei nespecifice cu produse de origine bacteriană deoarece, încă din anul 1883, a încercat tratarea unor cazuri inoperabile de cancer, provocând infecții cu diverși germeni și introducând în practică vaccinurile bacteriene mixte MBV ("mixed bacterial vaccines").



Un fapt experimental care a avut loc în anul 1959 a stimulat cercetarea teoretică și aplicarea în practica terapeutică a bacteriilor ca stimulatori nespecifici. Unele colective de cercetare din Franța, lucrând independent, au constatat că șoarecii și șobolanii tratați cu BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) devin tot mai rezistenți față de limfoamele maligne. Efecte similare au fost constatate și în cazul transplantării *in vivo* a liniei tumorale L<sub>1210</sub>, aceasta dezvoltându-se mai lent la animale pretratate cu BCG. Cam în același timp se demonstrează experimental că și *Corynebacterium parvum* (denumit ulterior *Propionibacterium*) are efecte stimulatorie nespecifice. În anii care au urmat, numărul germenilor incriminați a avea astfel de efecte a crescut considerabil, cuprinzând atât specii patogene, cât și specii condiționat patogene sau total inofensive (tabelul 129).

În favoarea efectelor stimulatorie nespecifice provocate de către bacterii, în afară de datele experimentale și de observațiile empirice, pledează și unele studii epidemiologice. De exemplu, incidența leucemiilor este mult mai scăzută la copii vaccinați BCG în comparație cu cei nevaccinați.

Tabelul 129

Diferite specii de germeni utilizați pentru proprietățile lor imunomodulatoare

<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Bacillus Calmette-Guerin</i> (BCG)	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>
<i>Candida neoformans</i>	<i>Mycobacterium leprae murinum</i>
<i>Corynebacterium parvum</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Coxiella burnetti</i>	<i>Nocardia rubra</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Toate acestea au generat optimism și speranțe, antrenând o largă aplicare a preparatelor mono- sau polimicrobiene ca stimulatori nespecifici, în special în clinica oncologică. Administrarea lor terapeutică se face în funcție de germenii folosiți ca stimulatori, de tipul tumorii, de localizarea ei etc. Sunt administrați "intralezional" sau "intratumoral" fiind inoculați direct în tumoră, sunt utilizați pentru tratament "sistemic" prin inoculări subcutanate, intramusculare, intradermice etc. Pot fi administrați "profilactic" sau "terapeutic" adică înainte de apariția tumorii sau după dezvoltarea ei. Sunt inoculați ca suspensii bacteriene inactivate, sub formă de suspensii uleioase, în asociere cu antigenele tumorale etc. De exemplu, BCG dă bune rezultate când este inoculat intrapleural la pacienții cu cancer pulmonar, sau intravezical la cei cu tumori ale vezicii urinare. De asemenea, ar avea unele efecte benefice în melanomul cutanat. Au fost și mai sunt încă folosite preparate mono- sau polimicrobiene cu diferite denumiri comerciale ca *Omnaadin*, *Polidin*, *Reactin*, *Ducton*, *Eu 4800*, *Prodigiousan*, *Stomasina*, *BCG-F*, *Lantigen* etc.

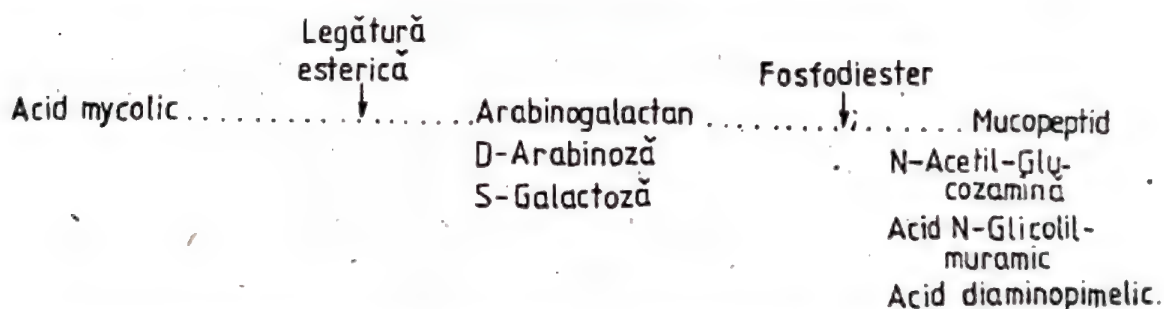
Dar, nici până în prezent nu sunt bine cunoscute schemele optime de tratament, dozele, căile de inoculare, intervalul dintre inoculări etc. Mai mult, unele date bazate pe cercetări imunologice riguroase semnalează apariția unor efecte nedorite induse de către imunostimulatorii bacterieni, dintre care cea mai evidentă este imunosupresia exprimată printre altele și prin favorizarea creșterii tumorilor



în loc de inhibiția dezvoltării lor. Specia sau chiar tulpina bacteriană folosită ca imunomodulator poate fi un factor hotărâtor de influențare a acestui efect. De exemplu, la *Corynebacterium parvum* au fost constatate diferențe marcante în activitatea imunostimulatoare în relație cu tulpina de germeni utilizată. Este foarte posibil ca specia sau tulpina bacteriilor să condiționeze proporția dintre factorii activatori și depresori ai reacțiilor imune, existenți la nivelul celulei bacteriene. Pentru evitarea efectelor nedorite pe de o parte, și pentru amplificarea efectului stimulant pe de altă parte, s-a recurs la folosirea unor substanțe simple din punct de vedere structural, provenite din bacterii sau din alte surse. S-a reușit obținerea de preparate purificate de "generația a II-a", a "III-a" sau chiar de "generația a IV-a", cu structură chimică simplă și bine cunoscută, lipsite de componentele inutile sau chiar nocive care formează "balastul" celulei bacteriene întregi.

### Extrakte de origine bacteriană

De regulă, au o greutate moleculară mică, exercită aceleași efecte stimulatorii ca și celula bacteriană, dar sunt lipsite de efectele secundare ale acesteia. Mare parte dintre aceste componente sunt localizate în peretele bacterian, motiv pentru care, în unele situații, este suficientă inocularea pereților celulari pentru obținerea activării funcționale a sistemului imun. La mycobacterii, de exemplu, peretele bacterian are acțiune adjuvantă, putând substitui bacteria. Mycobacteriile, Corynebacteriile, Nocardii etc. conțin în pereții lor 6,6'-diestertrehaloză cu diferiți  $\alpha$ - și  $\beta$ -hidroxiacizi, denumiți "acizi micolici" care pot forma "trehalose dymicolat" (TDM) sau "Cord factor" cu remarcabile proprietăți imunostimulente. De exemplu, șoarecii inoculați experimental cu "Cord factor" rezistă mai bine la infecții cu germeni patogeni decât martorii netratați. Componenta stimulatorie din peretele celular al mycobacteriilor ar fi alcătuită din două părți distincte, și anume: dintr-un mycolat de arabinogalactan, care este legat printr-un fosfodiester la un peptidoglycan, realizând următoarea structură peptidoglicolipidică:



Peptidoglicanul peretelui celular al mycobacteriilor este N-acetil-muramil-L-anil-D-izoglutamină, cunoscut sub denumirea comercială de "Muramil dipeptid" (MDP), care a fost realizat și sintetic și care are o marcantă activitate imunomodulatoare. Atunci când este inoculat o dată cu antigenul, stimulează sinteza anticorpilor, dovedind prin aceasta și proprietăți adjuvante. De asemenea, stimulează creșterea rezistenței nespecifice a organismului față de bacterii, virusuri, paraziți, activează sinteza unor limfokine sau monokine (IL-1; IL-2), exprimarea receptorilor pentru IL-2 pe suprafața limfocitelor T activate etc.

Au mai fost identificate și alte componente active din pereții bacteriilor. Este cazul substanței MER (methanol extraction residue, sau reziduul extractului metanolic) obținută prin tratarea celulelor BCG cu acetonă și metanol și care



conține atât fragmente de perete celular cât și "cord factor", al extractului fosfolipidic realizat din *Lysteria monocytogenes* (EPB), lipopolizaharizilor (LPS) obținuți din germeni Gram-negativi, peptidoglicanilor etc. (tabelul 130). Recent, noi am reușit să identificăm într-o tulpină foarte patogenă de *Pseudomonas aeruginosa* existența unor fosfolipide care nu sunt prezente în mod normal la nivelul acestor bacterii. Moleculele s-au dovedit a avea remarcabile proprietăți imunomodulatoare, preparatul comercial cu denumirea de "Cantastim" realizat pe baza acestora (Cantastim = Cantacuzino stimulent) dând rezultatele bune atunci când este administrat la pacienți cu imunodepresii, deoarece activează funcțiile macrofagelor, ale limfocitelor Tc, celulelor NK, normalizează funcțiile celulelor Th și Ts, echilibrează raportul normal dintre diferitele subpopulații de celule etc.

Tabelul 130

## Unii compuși naturali de origine bacteriană cu activitate imunostimulatoare

Denumirea compușilor	Sursa	Activitatea biologică
CPS-K (polizaharizi capsulari)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Adjuvant în sinteza de anticorpi
Cord factor	Diverși germeni	Imunostimulator general
EPB (Extract fosfolipidic bacterian)	<i>Listeria monocytogenes</i>	Activează fagocitoza și reactivitatea alogenă
Flagelina	Germeni Gram -	Activator policlonal
IPM (Interphase material)	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Imunostimulator al sistemului reticulo-endotelial (SRE)
MER (Methanol extraction residue)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Imunostimulator al SRE
OK - 432 (Picibanil)	<i>Streptococcus hemolyticus</i>	Inductor de interferon, inhibitor al tumorilor
Cantastim	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Imunoactivator, inhibitor al tumorilor
Peptidoglicani	Bacterii diverse	Activatori policlonali
LPS (lipopolizaharizi)	Germeni Gram-negativi	Activatori policlonali Adjuvanți în imunizări
SPA (proteina A stafilococică)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Activator policlonal, activator NK *

\* În realitate nu SpA este activator al funcțiilor NK ci niște "impurificări" ale preparatelor comerciale, cu greutatea de 2 kD, care provin probabil din pereții germenilor.

Din *Klebsiella pneumoniae* au fost izolate niște glicoproteine cu greutate moleculară mare, denumite comercial *Ru 41740* care *in vitro* activează sinteza IL-1 de către macrofage precum și sinteza de TNF. *In vivo* dă bune rezultate în infecțiile respiratorii cu etiologie virală sau bacteriană ca urmare a activării unor funcții ale macrofagelor, granulocitelor PMN, celulelor NK și a limfocitelor T și B. Din membrana acestei bacterii au mai fost izolați niște peptidoglicani care sunt activatori policlonali pentru limfocitele B.



Un produs de origine bacteriană bine cunoscut este LPS, care activează macrofagele și este mitogen pentru limfocitele *B* de șoarece acționând direct asupra acestora, dar și indirect, via IL-1 eliberat de către macrofage.

Din *S.haemoliticus* japonezii au purificat preparatul OK-432 cu denumirea comercială de "Picibanil" care, administrat asociat cu unele substanțe citostatice ca de pildă mitomicina C, este foarte eficient în terapia tumorilor. Este un potent inductor al formării și activării celulelor ucigașe și al sintezei de citokine.

Unele preparate se pot administra pe cale orală, fiind deci mai comode pentru pacienți. Este cazul produsului OM 89 obținut din *Escherichia coli*, eficient în prevenirea infecțiilor urinare și în artrita reumatoidă, mai ales datorită capacității sale de modulare a producerii locale de citokine. Stimularea apărării locale la nivelul mucoaselor digestive, și în special la nivelul celor respiratorii, poate fi de altfel realizată și cu un preparat comercial, "Bronho-Vaxom" alcătuit din opt extracte bacteriene obținute din *K.pneumoniae*, *Diplococcus pneumoniae* etc., care administrat oral dovedește a fi foarte eficient.

### **Imunomodulatori naturali, de origine animală**

Diverse țesuturi sau molecule de origine animală pot fi utilizate nu numai ca agenți terapeutici specifici sau selectivi, dar și ca imunomodulatori. Este cazul "tuftsinei", un tetrapeptid bazic cu largi implicații biologice, al unor preparate din sânge sau din timus etc. Au largă utilizare unii hormoni timici care pot influența maturarea limfocitelor *T*, ba chiar și imunoglobulinele administrate pe cale intra-venoasă. Acestea trebuie să fie lipsite de virusuri patogene (HbS, HIV), să aibă un spectru larg de activitate, adică să conțină toate subclasele de IgG, dar să nu conțină IgE sau IgA, pentru a nu provoca șoc anafilactic la pacienții cu deficit de IgA, și să nu fie administrate la subiecții cu crioglobulinemie. Imunoglobulinele au efecte benefice nu numai atunci când sunt administrate în infecții și în imunodeficiențe primare, situații în care pot fi administrate în doze de 300 - 500 mg/kg de greutate corporală o dată la 3 - 4 săptămâni, dar și în boli autoimune, ca de pildă în purpura idiopatică trombocitopenică. Administrarea lor modulează funcțiile limfocitelor *T* și *B* la pacienții cu boala Kawasaki (o boală acută, febrilă, la copii cu anevrism coronarian), în myastenia gravis, artrita reumatoidă, diabetul juvenil etc.

Neuropeptidele, ca de pildă endorfinele și enkefalinele, stimulează sinteza de IFN- $\alpha$ , de IL-2, activează funcțiile NK, comportându-se ca adevărați imunomodulatori. Enkefalinele modulează răspunsul imun umoral și celular într-o relație dependentă de doză: dozele mari suprimă, iar cele mici potențează sinteza de anticorpi, degranularea mastocitelor, reacțiile locale de hipersensibilitate etc. *Metenkefalina* întârzie dezvoltarea melanomului cutanat și ameliorează infecții cu HIV realizând o creștere tranzitorie a numărului de limfocite *T CD4*<sup>+</sup> și a răspunsului la stimulii mitogenici.

Recent, se încearcă utilizarea ca agenți imunomodulatori a unor monokine și limfokine cum ar fi IL-1, IL-2, TNF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , factorul de necroză a tumorilor (TNF), factorul de creștere a limfocitelor *B* (BCGF), de stimulare a coloniilor (CSF) etc. Aceștia acționează ca niște semnale extracelulare capabile să restaureze multe funcții imune. Trebuie totuși făcută o mențiune referitoare la acești imunomodulatori naturali. Dacă cei de origine bacteriană sau vegetală sunt de proveniență exogenă, monokinele și limfokinele sunt produse ale organismului, fabricate în mod normal de către acesta. Utilizarea lor își găsește justificare numai în acele situații în care sinteza lor, de către organismul pacientului la care urmează



să fie administrate, este defectuoasă. În caz contrar, ele sunt eliminate fără ca organismul la care au fost inoculate să poată "beneficia" de ele. Dar, pentru a cunoaște care este nivelul producției lor interne, este necesară dozarea, la fiecare pacient, a acestora. Desigur, operația nu este simplă, dar este absolut necesară, deoarece există riscul instituirii unei terapii iraționale care va da rezultate negative și va genera concluzii eronate. Mai mult, este absolut necesar ca să se cunoască modul de exprimare a receptorilor pentru citokinele folosite ca imunomodulatori la nivelul membranei plasmatică, deoarece există riscul ca să fie administrate, fără ca celulele care ar trebui să primească semnalele transmise de ele să poată recepționa mesajele.

### **Alte surse de imunomodulatori naturali**

Diverse substanțe, de origine animală, vegetală, fungică, au marcante proprietăți imunomodulatoare. Unele vitamine, cum ar fi vitaminele A, C, D, E, datorită capacității lor de activare nespecifică a funcțiilor citotoxice ale limfocitelor *T<sub>c</sub>* sau ale celulelor *NK*, de normalizare a mecanismilor de cooperare celulară, au o largă utilizare ca imunomodulatori în bolile neoplazice sau de altă natură. De exemplu, aproape toate celulele vertebratelor au receptori pentru vitamina D care ar avea un important rol imunoreglator. Astfel de receptori sunt pe monocite și pe limfocitele activate, dar nu pe limfocitele în repaus. Monocitele activate pot converti 25-hidroxitamina D3 (25 OHD), forma relativ inactivă a vitaminei D, în 1- $\alpha$ , 25'-dihidroxi vitamina D3, sau "calcitriol", forma biologic activă a acesteia, care poate modula celulele sistemului imun după legarea ei la receptorii specifici de la nivelul nucleului. Calcitriolul modulează funcțiile monocitelor și macrofagelor, activându-le producția de monokine (TNF, IL-1, PGE<sub>2</sub>), protejându-le de efectul stres-ului termic și blocându-le producția de IFN care poate inhiba mobilizarea Ca<sup>2+</sup> din oase. De asemenea, metabolizii vitaminei D influențează maturarea și diferențierea extratimică a limfocitelor *T*, inițial activând populația *T* și ulterior inhibând-o. După părăsirea timusului și pătrunderea lor în circulație, limfocitele *T* își pierd receptorii pentru vitamina D. Vitamina A și în special acizii retinoici, vitamina C, prin efectul lor antioxidant, sunt modulatori eficienți în imunodepresii și în special în cele asociate cu boala cancerosă.

Din diferite plante, ca de pildă din *Angelica sinensis* sau din *Cynancus auriculatus*, au fost obținute extracte care stimulează sinteza de IL-2. Din vâsc, a fost extras un preparat cu denumirea comercială de "Isador", din orz verde se extrage o enzimă cu activitate asemănătoare superoxidismutazei (SOD) care blochează eliberarea de O<sub>2</sub><sup>-</sup> și OH<sup>-</sup> de către granulocitele PMN, din *Symphytum officinale* a fost obținută o fracțiune bogată în principii care modulează unele funcții ale PMN etc.

### **Imunomodulatori cu structură chimică bine definită**

Aparțin așa-numitelor "generația a III-a" sau "a IV-a", au o structură chimică simplă și pot fi obținuți prin sinteză chimică sau prin tehnologii genetice de genul ADN recombinat. Ca atare, pot fi produși în cantități mari și în condiții riguroase de control al structurii lor. În general, această structură este asemănătoare, putând merge până la identitate, cu cea a compușilor naturali, dar există și produse sintetice care nu au nici o relație structurală cu produsele naturale (tabelul 131).

Imunostimulanți definiți chimic, utilizați în clinică (după J.W. Hadden)

Imunomodulatorul	Mod de acțiune	Activ în
<b>Derivați ai muramil-dipeptidului</b> - Murabutidul - Muramil tetrapeptid-fosfatidil-etanolamină (în lipozomi)	Activează macrofagele Activează macrofagele	Cancer, infecții Cancer
<b>Analogi ai lipidului A</b> - Monofosforil-lipid A - DT 5461	Activează macrofagele și limfocitele B Idem	Adjuvant ?
Ubenimex	Activează macrofagele și celulele NK	Cancer
<b>Peptide</b> - Timozina $\alpha 1$ - Factorul umoral timic (THF) - Tuftsina	Maturarea celulelor T Idem Stimulează macrofagele, celulele NK, granulocitele PMN	Cancer, hepatite HIV Infecții
<b>Substanțe timomimetice</b> - Ditiocarb - ST 789 - Metil inozin-monofosfat - Azimexona (Imexona)	Stimulează macrofagele celulele NK, PMN Idem Idem Stimulează limfocitele T și macrofagele	HIV Infecții HIV și infecții HIV
<b>Inductori de interferoni</b> - Ampligen - Bropirimin	Activează macrofagele și celulele NK Idem	Cancer, HIV Cancerul vezicii urinare

Compuși sintetici care au generat mari speranțe pentru terapia anticanceră, din care cauză au fost foarte bine studiați, sunt printre alții și Levamisolul (Decaris-ul produs în Ungaria) și MDP (Muramyldipeptid). Levamisolul hidrocloric, un izomer al tetramisolului, cu greutatea moleculară de 240, 75 D (0,240 kD), este un antihelmintic sintetic foarte activ contra nematodelor. În anul 1971 a fost semnalată capacitatea sa de a proteja șoarecii infectați cu tulpini patogene de *Brucella* și de a inhiba dezvoltarea tumorilor maligne solide. El influențează mecanismele de apărare aflate în hipofuncție imună datorită vârstei înaintate sau datorită unor boli, modulând în special răspunsul imun mediat celular. Această moleculă mică restaurează funcțiile macrofagelor, limfocitelor T și granulocitelor



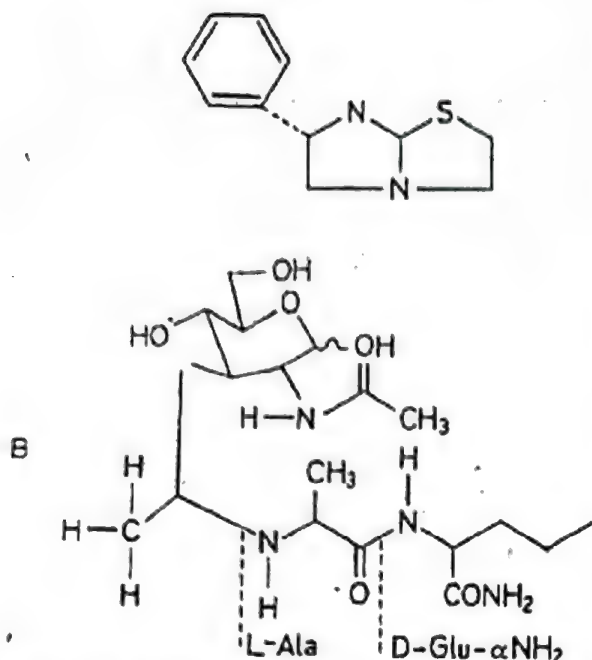


Fig.212. Molecula de Levamisol (A) și de MDP (N-acetyl-Muramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamină) (B) (după J. Symoens și M. Rosenthal).

PMN, restaurare exprimată printr-o mai activă sinteză și secreție de limfokine, prin activarea fagocitozei, chemotaxiei etc. Observațiile clinice ulterioare, însă, au semnalat instalarea în cursul tratamentului cu Levamisol a unor efecte secundare grave, ca de exemplu granulocitopenia sau chiar agranulocitoză, febră, urticarie, sau chiar lipsa de acțiune asupra funcțiilor imune la pacienții cu cancer operat sau cu melanoame.

Un alt imunostimulent sintetic cu remarcabile proprietăți adjuvante și imunomodulatoare este MDP (fig. 212). Are greutatea moleculară de 0,492 kD și reprezintă, după cum menționam anterior, componenta activă din peretele mycobacteriilor care, după ce a fost bine

cunoscută din punct de vedere structural, a putut fi realizată și sintetic. Administrat *in vivo*, MDP potențează răspunsul imun umoral, induce reacții de hipersensibilitate întârziată și mărește rezistența nespecifică a șoarecilor la infecții. Acționează în special asupra macrofagelor cărora le activează funcțiile secretorii (cu referire specială la sinteza și secreția de prostaglandine, de collagenază etc.), citostatice și citotoxice.

Numărul compușilor sintetici realizați și identificați ca imunomodulatori, ca de altfel și cel al modulatorilor naturali este în continuă creștere, iar modul lor de acțiune este diferit. Unii stimulează atât sinteza de mediatori solubili cât și funcțiile unor celule efectoare. Este cazul inductorilor de interferon de genul acidului poliinozolic: policitidilic (Poli I:C), tiloronului etc. Alții, ca de pildă MDP, Tuftsina, Bestatina, acționează direct asupra unor celule efectoare ale imunității, cu referire specială la macrofage, limfocite sau granulocite PMN. Astfel "Isoprinosina", obținută sintetic din "Inosină" și sarea acidului *p*-aceto-*midobenzoic* a *N-N*-dimetil amino-2 propanolol la raportul molar 1:3, activează proliferarea limfocitelor stimulate de către antigene sau mitogene, producția de IL-1 și IL-2, exprimarea receptorilor pentru IL-2, stimulează funcțiile macrofagelor și celulelor NK. "Imuthiolul" (sodium dietildetiocarbamat) prin gruparea "tiol" este asemănător ca structură chimică cu Levamisolul. *In vivo*, activează maturarea protimocitelor și evoluția lor rapidă spre limfocite *T* funcționale care pot răspunde optim la stimuli mitogenici, stimulează activitatea citotoxică a limfocitelor *Tc* și a celulelor NK, activează sinteza de anticorpi. "Danazol", un steroid androgenic, reduce titrul anticorpilor antitrombocitari, fiind eficient în purpura trombocitopenică idiopatică. "COP1", un polimer alcătuit din L-Ala, L-Glu, L-Cys și L-Tyr (AEKY) cu greutatea moleculară de 23 kD stimulează proteina bazică mielinică, suprimând inducerea experimentală a encefalomielitei alergice. Se pare că ar induce proliferarea unor celule supresoare specifice pentru anumite clone de limfocite *Tc*. "Cyclosporina A" inhibă mecanismele transcripționale, fiind un imunomodulator util în unele boli autoimune, ca de pildă în diabetul juvenil sau în uveite.



## MODALITĂȚI ȘI CĂI DE ADMINISTRARE A IMUNOMODULATORILOR

Administrarea preparatelor cu astfel de proprietăți este condiționată de către o serie de factori, cum ar fi: natura lor, boala care urmează a fi combătută, statusul imun al organismului etc. Într-un fel vor fi administrate niște preparate polimicrobiene și în alt fel produsele sintetice cu greutate moleculară mică. Într-un fel vor fi inoculate în cazul unor afecțiuni ale aparatului digestiv sau respirator, de pildă, și în alt fel în cazul unor leucemii. Cert este că, după cum menționam anterior, imunoterapia unor tumori poate fi realizată prin inocularea lor direct în tumoră, adică intratumoral sau intralezional, sau în afara ei, adică prin administrare sistemică. Se pot face administrări profilactice sau terapeutice; se poate face o singură administrare sau inoculări repetate, injectându-se un singur preparat sau o combinație de astfel de preparate etc.

De regulă, imediat după inocularea imunomodulatorilor, pentru un interval scurt de timp, sunt activate unele funcții imune și eventual depresate altele, după care urmează un declin al activității, cu revenirea acestor funcții la nivelul existent înainte de inocularea lor, sau chiar sub acest nivel (fig. 213).

În cazuri previzibile de stres, sau în cazul unor afecțiuni virale acute, poate fi suficientă o singură administrare. În deficiente imune cronice asociate cu bolile neoplazice sau cu unele infecții cronice, se pot practica administrări prelungite, timp de 2 - 3 luni de zile, dar intervalul dintre acestea să nu fie mai mic de 7 - 10 zile. Dacă inoculările se fac la un interval de timp mai scurt, atunci ele au toate șansele să se adreseze unui organism care are deja funcțiile stimulate spre limitele superioare, limite care practic nu mai pot fi depășite. Ca atare, urmează efectul contrariu celui dorit, adică de inhibiție prin exces de stimul și anularea efectelor terapiei instituite sau chiar agravarea bolii. Bineînțeles, o administrare corectă a imunomodulatorilor trebuie să se bazeze în primul rând pe date obiective referitoare la mecanismele lor de acțiune și, dacă este posibil, pe cunoașterea exactă a status-ului imun al pacientului la care se impune aplicarea terapiei sau profilaxiei cu modulatori. Trebuie subliniat faptul că o cunoaștere reală a potențialului imun al organismului nu poate fi realizată numai prin estimarea titrului anticorpilor serici față de unele bacterii sau virusuri. Este necesară investigarea unor celule efectoare ale imunității mediate celular, aprecierea funcțiilor macrofagelor, a limfocitelor etc. (tabelul 132). Numai un studiu complex și o evaluare a cât mai multor funcții imune poate fi într-adevăr eficientă.

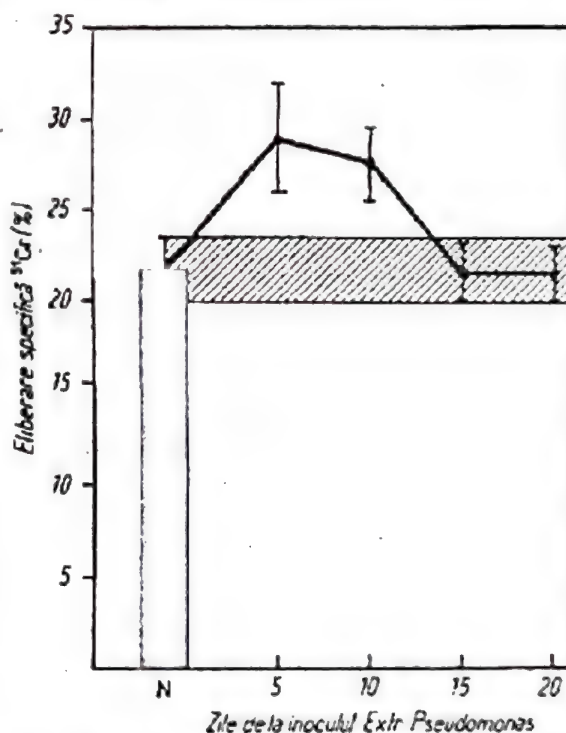


Fig. 213. Nivelul funcției NK în splina șoarecilor la diferite intervale de timp de la inocularea i.p. a produsului Cantastim obținut dintr-o tulpină patogenă de *Pseudomonas aeruginosa*. Activitatea citotoxică a celulelor NK a fost evaluată prin testul cu  $^{51}\text{Cr}$ , celula țintă fiind linia YAC1 marcată radioactiv (valorii medii + DS).



**Unele constante și funcții imunologice care pot fi evaluate de rutină  
într-un laborator cu dotare materială medie**

1. Numărul de limfocite/ml sânge după separarea lor prin centrifugare în gradient (Ficoll-Isopaque)
2. Numărul granulocitelor PMN/ml sânge, după separarea lor prin centrifugare în gradient de densitate (Ficoll-Isopaque)
3. Activitatea citotoxică NK asupra celulelor țintă din linii mieloide sau eritroleucemice marcate radioactiv, evaluată ca procent de eliberare specifică a  $^{51}\text{Cr}$
4. Activitatea citotoxică ADCC asupra unor celule țintă care au fixat specific anticorpul, evaluată ca procent de eliberare specifică a  $^{51}\text{Cr}$
5. Procentul limfocitelor *T* care exprimă receptori pentru eritrocite de oaie (CD 2) estimat prin tehnica rozetelor E
6. Procentul limfocitelor *T* supresoare (cu CD 2 termostabil) evaluat prin tehnica rozetelor E45
7. Eliberarea  $\text{O}_2$  de către granulocitele PMN nestimulate și stimulate în diverse condiții (zimozan opsonizat, concanavalină A, fitehemaglutinină etc.) \*
8. Proliferarea limfocitelor *T* stimulate policlonal (mitogenic) sau clonal (antigenic) *in vitro*, în diferite condiții de cultivare
9. Estimarea funcțiilor fagocitare, opsonică și neopsonică, a macrofagelor și PMN
10. Inhibiția migrării macrofagelor (metoda indirectă)

Bineînțeles că acest număr de teste poate fi amplificat. Trebuie de subliniat că imunomodulatorii, ca multe alte produse biologice sau chimico-farmaceutice, sunt mai eficace atunci când se administrează "preventiv", "profilactic", decât atunci când sunt administrate curativ, "terapeutic", afirmația fiind valabilă în special în cazul bolilor neoplazice. Este bine ca persoanele care au fost supuse unor factori de stres, femeile la vârsta menopauzei sau după această vârstă, oamenii aparent sănătoși dar care sunt mai "sensibili" la afecțiuni "a frigore" sau care din când în când fac pusee acute de infecții herpetice, cel puțin o dată într-un an să primească, o dată la 7 zile (adică săptămânal), timp de 8-10 săptămâni, câte o fiolă de Cantastim pe cale subcutanată, sau două fiole de Polidin pe cale intramusculară. O asemenea terapie "profilactică" este foarte indicată și pentru femeile care au suferit intervenții chirurgicale pe sân sau uter, chiar dacă acestea vizau eliminarea unor formații "benigne" (mastoză chistică etc.). O asemenea conduită previne multe situații grave care, dacă se instalează, practic nu mai pot fi anulate.

Imunomodulatorii pot fi administrați și în asociere cu unele autovaccinuri. Această manieră de tratament este foarte indicată și dă bune rezultate în infecțiile cronice stafilococice, streptococice, herpetice etc., rebele la terapia uzuală. De regulă, acești pacienți au dereglat raportul normal între subclasa limfocitelor *T<sub>s</sub>* și *T<sub>h</sub>*, în favoarea celor *T<sub>s</sub>*. Stimularea lor cu anatoxine, vaccinuri sau autovaccinuri este ineficientă, deoarece hiperfuncția celulelor supresoare inhibă uneori până la anulare răspunsul clonelor responsabile cu recunoașterea și neutralizarea agresorului respectiv. Asocierea tratamentului specific, adică anatoxina sau autovaccinul, cu imunomodulatorul care acționează nespecific, administrate pe baza unei scheme judicioase, asigură succesul terapeutic.

## MECANISME FUNDAMENTALE DE ACȚIUNE A IMUNOMODULATORILOR

Imunomodulatorii, în special cei cu structura complexă (molecule mari sau bacterii), pot acționa și ca antigene capabile să instaleze o stare de rezistență specifică față de alte microorganisme înrudite antigenic. De exemplu, BCG conferă protecție specifică față de alte mycobacterii, acționând în acest caz ca "antigen" și nu ca "imunomodulator". Dar, animalele tratate experimental cu BCG sau cu derivați ai acestuia devin mai rezistente la infecții cu *Listeria*, *E. coli* etc., care nu sunt înrudite antigenic cu mycobacteriile. Mai mult, la aceste animale se înregistrează o accelerare a rejecției alogrefelor și o inhibiție a dezvoltării sau diseminării unor tumori. În aceste cazuri nu mai poate fi vorba de o acțiune specifică, ci de una nespecifică. Din acest punct de vedere, imunomodulatorii ar putea fi clasificați în a) *antigenici* și b) *neantigenici*.

Ei pot acționa atât asupra funcțiilor sistemului imun cât și asupra altor funcții biologice ale organismului (fig. 214). Mecanismele care stau la baza acestor activități sunt complexe și în mare măsură necunoscute. Se știe doar, că ei activează proliferarea celulară și intensifică semnificativ cooperările celulare, ca o consecință a influenței lor asupra structurii dublului strat lipidic al membranei și, implicit, asupra receptorilor de membrană. De asemenea, activează sinteza unor mediatori solubili din grupa limfokinelor sau monokinelor, a imunoglobulinelor etc. În linii mari, imunomodulatorii acționează asupra macrofagelor, limfocitelor *T* sau *B*, celulelor *NK* etc. aflate în hipofuncție sau în hiperfuncție (tabelul 133).

Tabelul 133

Direcții de acțiune ale diversilor imunomodulatori (după M.A. Chirigos și J.E. Talmadge)

Celule sau funcții stimulate	Imunomodulatorii care stimulează
Macrofage	BCG, <i>C. parvum</i> , LPS, Lentinan, Glucan, Picibanil, MDP, Bestatin, IFN, Poli I:C, Tiloron, MVE, Tuftsin, MIF, MAF, Cantastim
Limfocitele <i>T</i> ajutătoare	IFN, IL-2, MVE-2, Poli I:C, Azimexona, Tiloron, BCG, Picibanil, Lentinan, <i>C. parvum</i> , Cantastim
Limfocite <i>T</i> supresoare	Timozina (fracțiunea 5), IL-2, Timozina-1, Picibanil, <i>C. parvum</i>
Limfocitele <i>B</i>	BCG, <i>C. parvum</i> , Lentinan, Cimetidina, Azimexona, Izoprinozina, Tuftsin, LPS, IFN
Diferențierea celulelor <i>T</i> din precursori	Timozina fracțiunea 5, Timozina 1, Izoprinozina, Levamisol, DTC
Limfocitele <i>T</i> activate	Levamisol, Tiobentazol, IL-1, BCG, Tiazolobenzimidazol, Azimexona, Izoprinozina, Glucan, Lentinan, Picibanil, Imidazol, Cimetidina, Timozina 1
Celulele <i>NK</i>	SpA, Picibanil, Cantastim

DTC=dietil-ditiocarbamat; IFN=interferon; IL=interleukine; MAF=factorul de activare a macrofagelor; MIF=factorul de inhibiție a macrofagelor; MVE-2=un copolimer divinil ester-anhidridă maleică; SpA=proteina A stafilococică.



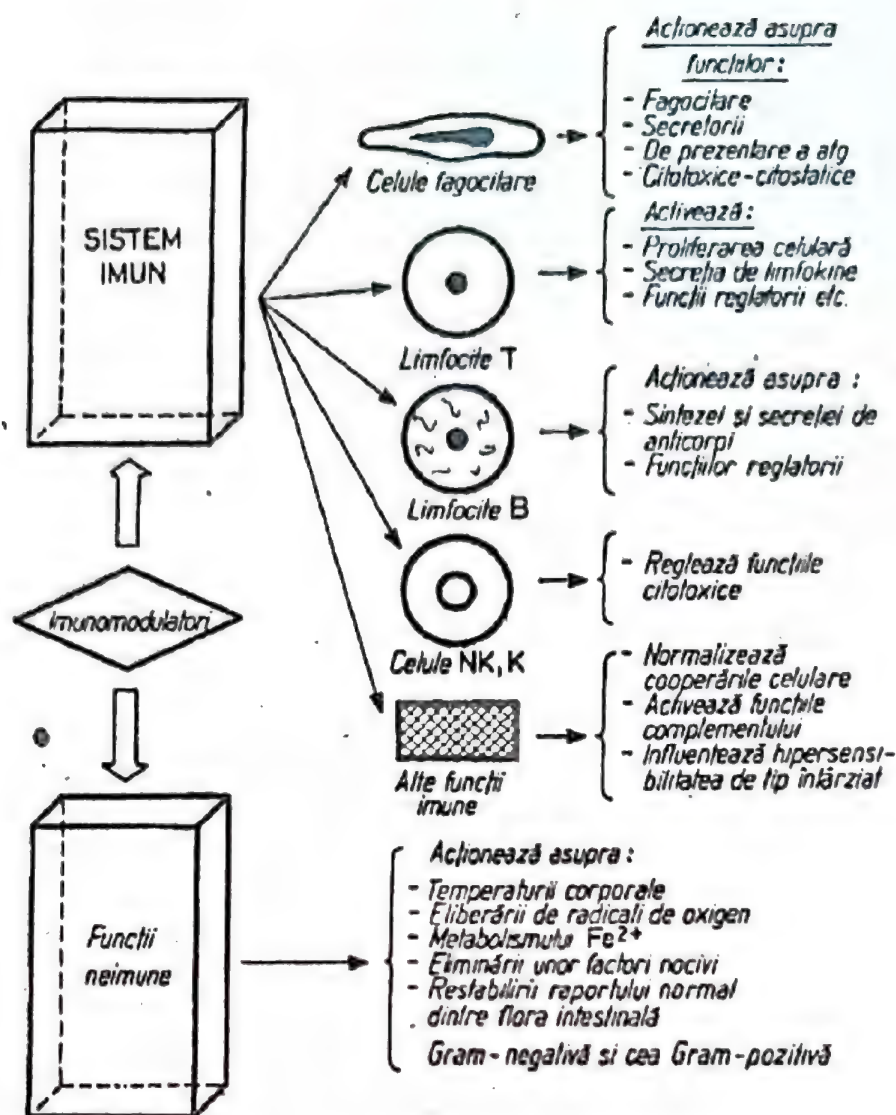


Fig.214. Diferite modalități de acțiune a Imunomodulatorilor.

### Acțiunea asupra macrofagelor

Macrofagele prelevate de la animalele tratate cu *BCG*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *Toxoplasma gondii* etc. au o capacitate sporită de inhibare nespecifică a microorganismelor. Sub influența lor, este stimulată creșterea conținutului de hidrolaze lizozomale, sunt activate fagocitoza, pinocitoza, funcțiile citostatice și citotoxice, exprimarea moleculelor MHC etc. Activarea lor funcțională se reflectă și la nivelul receptorilor Fc, monocitele putând efectua mult mai intens citotoxicitatea ADCC.

Optimizarea recunoașterii, fagocitării, prelucrării și prezentării antigenului într-o formă mai imunogenă facilitează declanșarea reacțiilor imune mediate celular sau umoral, care vor contribui la refacerea și menținerea homeostaziei. Un efect major al imunomodulatorilor este activarea funcțiilor secretorii ale macrofagelor. De exemplu, inocularea intraperitoneală a *BCG* urmată la două săptămâni de inocularea intravenoasă de LPS provoacă sinteza activă și eliberarea masivă în circulație a TNF, o citokină care poate necroza țesutul neoplazic dar nu și țesutul normal, cu important rol în protecția antitumorală. În afară de TNF, macrofagele activate de către modulatori mai produc activ IL-1, CSF etc.

## Acțiunea asupra limfocitelor T și B

Mulți imunomodulatori au efecte mitogene asupra limfocitelor *T* sau *B* cultivate *in vitro*. Dar, mitogenitatea nu corelează întotdeauna cu producția de mediatori solubili secretați de către limfocite sau cu creșterea numărului de celule efectoare cu funcție citotoxică. Unii dintre ei pot fi mitogeni *in vitro* pentru limfocitele unei specii și slab mitogeni sau chiar nemitogeni pentru limfocitele altei specii. De exemplu, Cantastim este mitogen pentru limfocitele de cobai și șoarece stimulate *in vitro* dar nu și pentru limfocitele de om (tabelul 134).

Tabelul 134

Efectul Cantastimului asupra limfocitelor de cobai și de om cultivate *in vitro*  
(valori medii  $\pm$  deviația standard a mediei pentru trei experimente diferite)

Limfocite de	Culori maror		Culturi stimulate cu 10 $\mu$ g Cantastim
	Nestimulate	Stimulate cu 10 $\mu$ g LPS	
Cobai	495 $\pm$ 316	917 $\pm$ 250	862 $\pm$ 320
Om	309 $\pm$ 80	304 $\pm$ 56	160 $\pm$ 45

Cu toate acestea, încorporarea de timidină tritiată ( $^3\text{H-Td}$ ) în ADN-ul limfocitelor umane sau al unor specii de animale de laborator poate constitui un mijloc simplu, obiectiv și relativ comod de testare comparativă a unor substanțe pentru evidențierea unor posibile proprietăți adjuvante sau imunomodulatoare ale lor. Activarea policlonală a limfocitelor poate produce uneori creșterea numărului de celule *Tc*, a numărului de limfocite *B* secretoare de imunoglobuline etc. Se pare însă că aceste activări nu se fac direct, prin relația imunomodulator-limfocit, ci via macrofag, care prin atributele sale funcționale va antrena policlonal întreaga populație

Tabelul 135

Dinamica valorilor unor constante și funcții ale imunității mediate celular,  
în relație cu unele date clinice, la o pacientă cu LI CT, la diferite  
momente după administrarea de Cantastim

Examen clinic, funcții imune	Momentul investigării		
	I	II	III
Greutatea corporală (kg)	50	52	58
Prezența leziunilor cutanate *	+++	+	
Nr. limfocitelor/ml sânge **	21,5 $\times 10^6$	4,8 $\times 10^6$	4,4 $\times 10^6$
Activitatea NK (% elib. specif. $^{51}\text{Cr}$ )	4,87	7,32	17,91
Activitatea ADCC (% elib. spec. $^{51}\text{Cr}$ )	35,14	51,81	59,61
Rozete E totale (% limf. T)	54,00	65,00	62,00
Rozete E <sub>45</sub> (T supresor)	20,35	17,17	7,80

\*Pacienta prezenta numeroase infecții și acumulări serosangvinolente subcutanate.

\*\*După separarea prin centrifugare în gradient de densitate Ficollpaque.

Determinările efectuate în momentul I=înainte de tratament; II=după prima serie de inoculări;  
III=după a doua serie de inoculări de Cantastim.



limfoidă. În general este acreditată ideea că imunomodulatorii naturali sau sintetici readuc la normal funcțiile limfocitelor, monocitelor sau granulocitelor PMN. Ei ar fi eficienți numai în cazurile în care dereglarea imună este asociată cu prezența în circulație sau la nivelul organelor limfoide secundare a unui număr normal sau chiar crescut de limfocite imature funcțional. Noi am constatat asemenea efecte folosind imunomodularea cu Cantastim în diferite boli neoplazice, inclusiv leucemiile. Tabelul 135 exemplifică rezultatele obținute într-un caz de leucemie limfatică cronică T (LLCT).

În absența macrofagelor sau a celulelor limfoide, sau în cazul unor alterări profunde, ireversibile, la nivelul acestor populații celulare, imunostimularea nespecifică devine un non-sens.

### **Acțiunea asupra celulelor nativ ucigașe (NK)**

Celulele NK, efectoare ale citotoxicității nespecifice sunt activate funcțional *in vivo* de către BCG, MDP, IFN, acidul retinoic, Picibanil, Cantastim etc. Ca și în cazul normalizării funcționale a celorlalte tipuri de celule, funcțiile NK se mențin la un nivel ceva mai crescut un timp limitat, după care revin la valorile inițiale. De exemplu, celulele NK recoltate de la șoarecii tratați cu Cantastimucid *in vitro* celulele din linia eritroleucemică YAC<sub>1</sub> mult mai intens decât cele provenite de la animalele netratate. După 5 - 10 zile de la inocularea imunomodulatorului, eliberarea specifică de <sup>51</sup>Cr din celulele tumorale marcate, eliberare care este expresia lizei acestora de către celulele NK, scade la valorile inițiale și uneori chiar sub aceste valori.

### **Acțiunea asupra celulelor supresoare**

Imunomodulatorii diminuează sau chiar anulează efectele imunosupresoare ale unor agenți de genul metilcolantrenului, cytarabinei, ciclofosfamidei etc. Este posibil ca această anulare să fie realizată prin acțiunea directă asupra limfocitelor T sau asupra macrofagelor.

Dar imunomodulatorii pot avea și efecte diametral opuse. În absența agenților supresori, deci în stări de hiperfuncții, pot ei înșiși acționa ca stimulatori ai celulelor Ts, ai limfocitelor B supresoare sau macrofagelor supresoare. De exemplu, la șoarecii tratați cu BCG, proliferază celulele care suprimă răspunsul limfocitelor T stimulate *in vitro* cu PHA sau ConA, inhibă funcția limfocitelor Th și Tc. Aceste celule sunt aderente la sticlă și au funcții fagocitare, ceea ce sugerează natura lor macrofagică.

În afară de macrofage supresoare, tratamentul *in vivo* cu BCG, *C. parvum*, Levamisol etc. activează și proliferarea limfocitelor Ts. Aceste date sugerează că efectul modulator este rezultatul antrenării *in vivo* a diverși factori, uneori cu funcții opuse, care concură la menținerea echilibrului, atât de labil, existent între activarea și supresia răspunsului imun și care în esență, în condiții normale, nu reprezintă altceva decât diferite aspecte ale funcțiilor de imunoreglare.

Poate că datorită acestor motive se impune multă prudență în aprecierea efectelor stimulatorii ale unor produse biologice, mai ales atunci când se recurge la teste experimentale simple, ca de pildă evaluarea indicelui splenic.

### **Alte mecanisme posibile de acțiune**

O manieră de amplificare a funcțiilor de apărare imună realizată de către imunomodulatori este stimularea sintezei unor citokine de către alte citokine sau, altfel spus, activarea rețelei efectorilor moleculari. Mulți dintre ei influențează sinteza și secreția de citokine sau exprimarea receptorilor pentru aceste citokine.



Dar, pentru înțelegerea modului de acțiune a lor, trebuie cunoscute bine proprietățile lor biologice și funcționale care să permită instituirea unei administrări raționale. În caz contrar, rezultatele pot fi descurajante. De exemplu, o doză prea mare dintr-un produs cu calități certe imunomodulatoare poate fi imunodepresoare sau chiar nocivă, cum este cazul IFN $\gamma$  care, incorect administrat, poate accelera dezvoltarea nefritei lupice.

Unii imunomodulatori, cum ar fi unele preparate polimicrobiene sau Cantastim, provoacă la unii pacienți imediat după inoculare o creștere pasageră a temperaturii corporale, care poate stânjeni pentru un timp proliferarea celulelor neoplazice sau multiplicarea virală. Uneori, această stânjenire pasageră este suficientă pentru a permite mijloacelor imune de apărare lichidarea agresorului aflat în dificultate.

Linfocitele, macrofagele, polimorfonuclearele sunt antrenate în detectarea prezenței Fe $^{2+}$ , fie direct, fie prin intermediul unor proteine de tipul "lactoferinei" sau "transferinei", contribuind la stocarea și reciclarea acestuia în organism. Or, atât bacteriile cât și celulele canceroase necesită cantități sporite de Fe $^{2+}$  pentru sinteza acizilor lor nucleici. De aceea, imunomodulatorii, stimulând proliferarea policlonală a limfocitelor și activarea macrofagelor, vor contribui la o mai bună utilizare a Fe $^{2+}$ . O parte din acesta va fi stocat în macrofage și în celulele dendritice din splină, afectând – prin scăderea concentrației sale – condițiile necesare multiplicării bacteriilor sau celulelor canceroase. Poate că acesta este unul dintre mecanismele de acțiune a unor oxidanți ca vitamina A care, pe lângă activarea funcțiilor NK, reglează și nivelul Fe $^{2+}$  liber din organism.

Proteina A stafilococică, datorită proprietății sale de a se lega la fragmentul Fc al imunoglobulinelor, poate fixa complexe imune circulante, îndepărtând o parte dintre factorii blocați existenți în serul purtătorilor de tumori. Desigur că, în caz de deficit de sinteză, administrarea de interleukine, de factori de creștere, de hormoni timici normalizează rapid funcțiile celulare care sunt condiționate de prezența acestora.

Scăderea factorilor blocați, activarea complementului, creșterea numărului de celule formatoare de rosete, normalizarea proporției de limfocite Ts (CD 8 $^{+}$ ), activarea funcțiilor NK și Tc, intensificarea reacțiilor de hipersensibilitate etc. sunt tot atâtea mijloace nespecifice de activare sau de normalizare a reacțiilor de apărare imună, realizate de către imunomodulatori, finalizate prin creșterea rezistenței organismului la agresiunea tumorală (fig. 215).

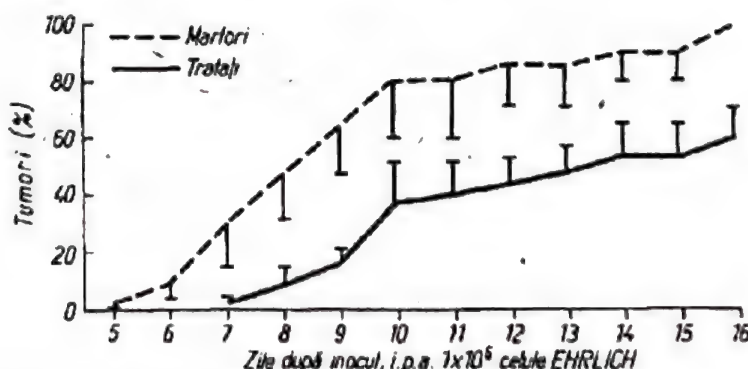


Fig. 215. Dinamica apariției tumorii ascitogene la șoarecii A $_2$ G inoculați i.p. cu  $1 \times 10^6$  celule Ehrlich, pretratați cu Cantastim (linia continuă) și la martorii care nu au primit terapia imunomodulatoare (linia întreruptă). La 16 zile de la inoculul celulelor tumorale, toți șoarecii din loturile martor au dezvoltat tumora ascitogenă (100%), pe când cei supuși terapiei imunomodulatoare au avut ascită în proporție de 50%. Datele reprezintă valorile medii  $\pm$  DS ale procentelor de animale cu tumoră la diferite zile de la inoculul celulelor Ehrlich. Au fost efectuate 3 experimente diferite (câte 40 de șoareci pentru fiecare experiment).



Indiferent de originea și de modul lor de acțiune, imunomodulatorii ridică unele probleme legate de gradul lor de puritate și de posibile efecte nocive pe care le-ar putea avea, în cazul în care ar conține și molecule cu efecte vătămătoare. În afară de aceasta, în special în cazul imunomodulatorilor de origine animală, se ridică problema oportunității sau inoportunității administrării lor. De pildă, unele peptide timice cum ar fi timopoietina, "factorul umoral timic" (THF) etc., sau unele citokine ca interferonii, IL-1, IL-2, G-CSF și alții sunt administrați în scop terapeutic la pacienții cu boli neoplazice. În unele cazuri, rezultatele sunt pozitive, pe când în altele sunt incerte sau total negative. Dar, aceste preparate biologice, spre deosebire de cele de origine bacteriană sau vegetală, sunt produse de către organismul uman. Pare deci logică ideea ca, înainte de administrare, să fie determinate calitativ și cantitativ prezența lor în umorile și țesuturile pacientului precum și modul de exprimare a receptorilor pentru ele la nivelul diferitelor celule. Dacă sinteza lor este nealterată și dacă celulele exprimă receptori pentru ele, atunci ce rost mai are administrarea de astfel de citokine? În cazul interferonilor, în loc de administrarea lor pasivă, de-a gata, nu este mai judicios și mai benefic pentru pacient să i se administreze inductori de interferoni? De altfel, în unele boli este mai indicată administrarea de inhibitori ai unor citokine decât inocularea acestora. Este cazul stărilor alergice, unde inhibitorii de IL-4 sunt mai eficienți decât administrarea de interferoni.

#### ASEMĂNĂRI ȘI DEOSEBIRI ÎNTRE SUBSTANȚELE IMUNOMODULATOARE ȘI CELE ADJUVANTE

Deoarece multe preparate modulează dar și stimulează reacțiile imune, o delimitare absolut categorică între aceste două categorii este greu de făcut, multe dintre ele acționând atât ca imunomodulatori cât și ca adjuvanți. De pildă, endotoxinele și LPS acționează ca modulatori ai răspunsului imun dar și ca adjuvanți, în timp ce saponina sau hidroxidul de aluminiu sunt folosite numai ca adjuvanți.

Între aceste două grupe de substanțe ar fi unele deosebiri esențiale, și anume:

a. Preparatele imunomodulatoare readuc în limite normale funcțiile imune, activându-le atunci când sunt depresate sau inhibându-le atunci când sunt exagerat de active. Adjuvanții au numai proprietăți stimulatoare.

b. Imunomodulatorii sunt administrați în afara stimulului antigenic și acționează independent de acesta. Adjuvanții sunt inoculați obligatoriu împreună cu antigenul. Ei sunt substanțe cu structuri moleculare diferite care măresc imunogenitatea antigenului atunci când sunt inoculați împreună cu acesta, motiv pentru care multe vaccinuri au asociate substanțe adjuvante. Activitatea lor depinde de capacitatea de activare a limfocitelor T și bineînțeles și a macrofagelor. Dintre adjuvanți, bine cunoscuți sunt adjuvantul *Freund* complet sau incomplet, gelul de hidroxid de aluminiu, saponina, silicatul de aluminiu, gelul de poliacrilamidă, celuloza, endotoxina germenilor Gram-negativi (care de fapt este un complex lipoproteic asemănător ca efect cu ceara D a bacilului Koch), vitamina A etc.

Calități de adjuvant au și grupările purtătoare ("carrier") ale antigenelor, deoarece numai în prezența lor haptenele pot deveni imunogene. Chiar și anticorpi au astfel de calități: un preparat antigenic devine mai imunogen atunci când este inoculat sub formă de complex antigen-anticorp în ușor exces de antigen, decât atunci când antigenul este inoculat singur sau în cadrul unui complex cu



exces de anticorpi. Complexat cu anticorpii, antigenul devine mai accesibil macrofagelor care-l fagocitează mai ușor (fagocitoză opsonică) și-l degradează mai eficient în fagolizozom.

Din punct de vedere practic, se cunosc patru grupe de adjuvanți:

1. *Saponinele* de origine vegetală care stimulează sinteza anticorpilor, activează limfocitele  $T_c$ , reacțiile de hipersensibilitate de tip întârziat, sinteza de interferoni și exprimarea moleculelor MHC de clasa II pe suprafața macrofagelor, limfocitelor  $T$  ajutătoare, limfocitele  $B$  etc.

2. *Polimerii neionici*, alcătuiți din *polloxipropilene hidrofobe* și *polioxietilene hidrofile*, cu efecte stimulatoare asupra răspunsului imun umoral.

3. *Monofosforil-lipid A*, un derivat al LPS cu acțiune asupra limfocitelor  $Th_1$ . Este un potent activator al sintezei de IFN.

4. *Citokinele*, ca de pildă  $IFN_\gamma$  care stimulează limfocitele  $Th_1$ , activează eliberarea de IL-1 și exprimarea de molecule MHC de clasa II de către macrofage. Interferonul gamma a dat bune rezultate când a fost asociat cu vaccinul anti-hepatita B (Hbs) sau cu sporozoiții de *Plasmodium falciparum* în vederea inducerii imunității față de hepatita virală sau malarie.

Mai sunt utilizate IL-2, G-CSF, GM-CSF etc.

Adjuvantul Freund, care stimulează limfocitele  $Th_1$ , nu este acceptat pentru administrare în clinică deoarece există riscul de inducere a reacțiilor autoimune, risc care de altfel există și la alte preparate de acest gen. Sunt acceptate preparatele de aluminiu care stimulează limfocitele  $Th_1$  și răspunsul imun umoral. Aceste preparate dau bune rezultate atunci când sunt asociate cu vaccinul anti-malarie.

Deci, compoziția chimică a moleculei sau modul de asociere a acesteia cu alte molecule condiționează calitatea de adjuvant al unei substanțe. De exemplu, adjuvantul Freund incomplet este alcătuit din ulei de parafină în care a fost introdus un emulgator (lanolina) care avea atât grupări hidrofobe cât și grupări lipofile. Adjuvantul Freund complet conține în plus și mycobacterii omorâte, al căror principiu activ este ceara D, un complex glucido-lipido-poli-peptidic responsabil de efectul de adjuvanțiere. Componenta lipidică conține acizi grași ramificați de genul "acidului micolic", cea glucidică conține galactoză, arabinoză, manoză etc., iar cea peptidică, aminoacizi ca D-Ala, D-Glu, acidul diaminopimelic etc. Modul de acțiune al adjuvanților este complex dar, în linii mari, se poate afirma că ei pot stimula selectiv celulele prezentatoare de antigen și limfocitele  $T$  sau  $B$ .

Practic, ei realizează următoarele:

a. Prelungesc prezența antigenului în organism sub formă de depozit, de unde acesta este eliberat treptat. De exemplu, adjuvantul Freund incomplet întârzie degradarea locală și eliberarea antigenului, acesta fiind găsit la locul de inoculare chiar și după șase luni de la introducerea sa în organism.

b. Permite dispersarea antigenului pe cale limfatică și facilitează accesul acestuia în ganglionii limfatici.

c. Unii adjuvanți, cum ar fi adjuvantul Freund complet, determină instalarea hipersensibilității de tip întârziat, activând funcțiile limfocitelor  $T_d$ .

d. Pot stimula diviziunea limfocitelor, activând proliferarea clonală sau policlonală a acestora. Au, deci, efect mitogen.

e. Activează funcțiile lizozomale ale macrofagelor, făcându-le să funcționeze mai eficient. În acest fel, substanțele pe care enzimele lizozomale le degradează mai greu devin mai vulnerabile și ca atare mai imunogene.

Bineînțeles că, în afară de cele menționate mai sus, mai există și alte mecanisme prin care se realizează proprietățile de adjuvant ale diferitelor substanțe.



Dar, după cum a rezultat din cele expuse, modul și mecanismele de acțiune ale imunomodulatorilor diferă fundamental de cele ale adjuvanților, deși uneori ele par a avea efecte asemănătoare.

*De la speranțe la realitate.* În esență, imunomodularea nu reprezintă altceva decât o activare a întregului ansamblu de mijloace imune ale organismului. Dar această activare reprezintă doar o "alarmă generală", care pune în stare de veghe absolut toate tipurile de "arme de luptă".

Descoperirea imunostimulatorilor nespecfici a generat speranțe și entuziasm. Se spera că, în sfârșit, au fost găsite mijloacele terapeutice care vor vindeca "miraculos" multe dintre bolile cronice și în special pe cele neoplazice. Din păcate, entuziasmul inițial a ajuns la cote ceva mai scăzute, succesele terapeutice nefiind pe măsura speranțelor. S-a constatat că nu se obțin în mod constant rezultate pozitive, fluctuațiile fiind generate de către o serie de factori ca: stadiul bolii în momentul începerii tratamentului, competența imună a pacienților, tulpina de germeni, doza, calea de inoculare, frecvența și durata inoculărilor, momentul începerii tratamentului raportat la momentul intervenției chirurgicale, iradierii sau chimioterapiei (în cazul tumorii) etc.

În multe cazuri, au fost obținute efecte contrare celor scontate, fapt care a făcut pe unii să afirme că terapia nespecifică este un risc și nu o binefacere. Dintre riscurile potențiale ale acestei terapii, atunci când se administrează incorect de către persoane ignorante și incompetente, pot fi amintite:

- a) sensibilizarea organismului la imunostimulent (atunci când acesta este imunogen sau alergizant);
- b) dezvoltarea de reacții autoimune;
- c) creșterea nivelului seric al anticorpilor blocanți;
- d) creșterea numărului de celule supresoare sau activarea lor funcțională;
- e) pot fi toxice pentru celulele limfoide sau mieloide;
- f) pot provoca apariția leucemiilor limfoide sau mieloide.

Pentru evitarea acestor situații și pentru obținerea rezultatelor care pot fi benefice și nu dăunătoare, se impune cercetarea fundamentală a modului de identificare a modulatorilor, a modului lor de acțiune precum și a modului lor de administrare. În cazul bolii canceroase, se impune asocierea judicioasă a terapiei imunomodulatoare nespecifice, cu terapia specifică antineoplazică, deoarece numai distrugând tumora și stimulând sistemul imun se pot obține rezultate evidente. În orice caz, modularea nespecifică a răspunsului imun rămâne o problemă deschisă, plină de necunoscut, dar și de atracții, atât pentru cercetător cât și pentru clinician.

## MIJLOACE DE APĂRARE IMUNĂ LA NIVELUL CAVITĂȚII BUCALE

Cavitatea bucală, datorită rolului ei fiziologic, este o parte a organismului foarte expusă contactului permanent cu flora microbiană și virală existentă în alimente și apă.

Pentru a neutraliza posibilitatea de penetrare a agenților străini în intimitatea țesuturilor și alterarea funcțională a lor, la nivelul acestei cavități există un arsenal de mijloace de apărare nespecifică și specifică alcătuit din bariere mecanice, diverse secreții și, bineînțeles, din numeroase celule care formează un adevărat *țesut limfoepitelial asociat mucoasei*. Stratul epitelial al mucoasei bucale formează, atât timp cât este intact, o barieră de nepătruns pentru germenii patogeni din exterior. El este în permanență umectat de către produsele de secreție ale glandelor salivare care, pe de o parte elimină mecanic corpii bacterieni depuși pe suprafața mucoaselor, iar pe de altă parte îi distrug prin substanțele bactericide pe care le conțin.

În afară de protecția strict mecanică realizată de către mucoase, există și alte mijloace nespecifice, dar și specifice, de apărare la nivel oral, dintre care mai importante sunt:

a. Mijloace nespecifice: saliva și componentele ei, pH-ul secrețiilor, fagocitoza neimună.

b. Mijloace specifice: imunitatea umorală mediată de către anticorpi și imunitatea celulară mediată de către limfocite Tc și alte populații celulare.

### MIJLOACE NESPECIFICE DE APĂRARE

a. *Saliva*. Este un lichid incolor și vâscos, produs al secrețiilor glandelor submaxilare, sublinguale și al parotidelor. Conține cca 97 - 98% apă, 1 - 2% săruri de Ca, Na, Mg și în special K, și cca 1% mucine, globuline etc. De asemenea, conține unele enzime cum ar fi *amilaza*, care hidrolizează amidonul în dextrină și maltoză, *maltaza* care continuă hidroliza amidonului etc. Are un pH ușor alcalin (7,4 - 8,0) cu rol de tampon, grație bicarbonaților și fosfaților din compoziția sa.

Enzimele, pH-ul, eliminarea mecanică a bacteriilor ca urmare a fluxului secretoriu continuu (800 - 1 000 ml/zi) fac ca saliva să fie un puternic factor de menținere a condițiilor normale la nivelul cavității bucale. La aceasta contribuie și prezența din abundență a *lizozimului*, o proteină bazică descoperită de către Al. FLEMING în 1922, care acționează ca enzimă mucolitică desfășurând legăturile dintre *N-acetil-glucozamină* și *acidul N-acetilmuramic* din complexe mucopetide existente la nivelul peretelui bacterian. Lizozimul se găsește din abundență și în granulele celulelor fagocitare, în secrețiile nazale, conjunctivale etc., poate



liza bacteriile sau le poate ucide prin mecanisme non-litice, cooperând în acest sens cu moleculele de anticorpi, în special cu cei IgA-secretor.

*b. Fagocitoza imună*, efectuată de către granulocitele PMN și intervenția proceselor inflamatorii, limitează și diminuează până la anulare posibilitățile instalării unor procese infecțioase la acest nivel. De exemplu, în cazul apariției unor porți deschise datorită unor leziuni ale epitelului sau smalțului dentar, germeii pot pătrunde în intimitatea țesuturilor. Multiplicarea lor este însă limitată, deoarece intervin procese inflamatorii care formează o adevărată barieră, un perete despărțitor care izolează focarul infecțios și protejează țesutul normal din vecinătate. Au loc un masiv aflux de granulocite, și o intensă eliberare de factori chemotactici și de mediatori ai inflamației care afectează chemotactismul și fagocitoza, stimulând distrugerea agresorilor și anihilarea infecției. Organele limfoide secundare asociate tubului digestiv, și anume amigdalele, ganglionii retrofaringieni, ganglionii parotidieni, sublinguali etc., formează un inel de apărare la nivelul căruia au loc atât distrugerea nespecifică a germeilor, prin fagocitoză și procese inflamatorii, cât și cooperări celulare generatoare de răspuns imun specific.

Inflamațiile amigdalelor, ale formațiunilor limfoide perifaringiene sunt procese frecvent întâlnite în clinică. Ele sunt manifestările răspunsului la agresiuni bacteriene, amigdalectomia practică adeseori ținând îndepărtarea unui "focar infecțios".

Dar oare, o dată cu "focarul", nu se elimină și niște mijloace de apărare potente ale organismului?

## MIJLOACE SPECIFICE DE APĂRARE

### APĂRAREA CAVITĂȚII BUCALE PRIN MIJLOACE IMUNE MEDIATE UMORAL

Este realizată practic de către toate clasele de imunoglobuline, rolul major revenind însă clasei IgA. Din totalul limfocitelor B și al plasmocitelor secretoare de anticorpi existent la nivelul cavității bucale și al organelor limfoide secundare care protejează această cavitate, 6 - 8% produc anticorpi din clasa IgM, 4 - 5% din clasa IgG și 2-4% din clasa IgD. Restul de cca 80 - 90% sunt celule secretoare de IgA, sinteza anticorpilor IgE fiind inexistentă în această regiune a organismului. În cazul unui deficit de sinteză de IgA, în populația de plasmocite salivare se constată o sporire a numărului de celule producătoare de IgD, situație întâlnită și în cazul secrețiilor lacrimale și nazale, dar nu și la nivelul intestinului.

Plasmocitele secretoare de IgA se găsesc dispersate în toată cavitatea bucală, cu precădere printre acinii salivari și ciorchinii glandulari asociați ductilor excretori ai glandelor salivare. Aceștia produc peste 95% din totalul de imunoglobuline existent în salivă. Cu alte cuvinte, în salivă sunt cca. 95% molecule de IgA secretor, restul fiind molecule de IgA seric (5%). De regulă, aceste molecule de anticorpi sunt dimeri IgA care au lanțul J și componenta secretorie sintetizată în apropierea glandelor salivare. Plasmocitele aflate la nivelul unei astfel de glande produc cca. 0,04 grame de molecule/zi, iar cele aflate la nivelul glandelor submandibulare, cca. 0,08 g/zi. Existența acestor cantități masive de molecule de IgA secretor la nivelul glandelor salivare permite ideea că aceste glande pot constitui structuri imunologice cu rol important în apărarea antibacteriană și antivirală de la nivelul cavității bucale. Dintre celulele producătoare de IgA, 36 - 38% sintetizează anticorpi din subclasa IgA<sub>2</sub> iar 62 - 64%, anticorpi din subclasa IgA<sub>1</sub> dimer.

În comparație cu alte specii de mamifere, la om, țesutul limfoepitelial asociat mucoasei este mai sărac în celule limfoide. Aceasta ar putea explica în parte rezultatele mediocre obținute atunci când se practică aplicarea locală, pe mucoasă, a vaccinului.

Se pare că o parte dintre limfocitele secretoare de astfel de anticorpi din cavitatea bucală sunt stimulate de către antigene la nivelul amigdalelor. Aceste organe limfoide se deosebesc de alte structuri limfoepiteliale prin numeroasele lor cripte, la nivelul cărora se poate acumula material antigenic în cantități suficiente realizării stimulului necesar. Aici s-ar face cooperarea celulelor APC cu limfocitele *Th* și cu cele *B*, cooperare finalizată prin apariția plasmocitelor secretoare sau, după caz, prin activarea proliferării clonale a limfocitelor *T* citotoxice. Așa s-ar explica descreșterea masivă a anticorpilor IgA salivari după amigdalectomie sau după infecții care alterează profund structura amigdalelor, cum ar fi mononucleoza infecțioasă. În astfel de situații, are loc o creștere locală compensatorie a nivelului IgD, probabil ca o consecință a stimulării limfocitelor *B* de către unele microorganisme care au putut prolifera nestânjenit în absența anticorpilor IgA secretorii, anticorpi nocivi pentru astfel de specii.

În realitate, există o rețea unică, un fel de *sistem imunologic comun al mucoaselor*, responsabil de sinteza imunoglobulinelor secretorii, compus din celulele și formațiile limfoide de la nivelul epiteliului intestinal, pulmonar, salivar și conjunctival. Limfocitele *B* de memorie pot recepționa semnalele antigenice la nivelul plăcilor Peyer, amigdalelor și chiar al ganglionilor limfatici, după care unele dintre ele pot migra pe cale limfatică sau sangvină spre diverse locuri, cum ar fi splina, ganglionii limfatici, glandele salivare, mucoasele alveolelor respiratorii etc. unde se diferențiază în plasmocite producătoare de IgA secretor (fig. 216).

Se știe că migrarea unor celule spre diferite locuri ar fi controlată de receptori pentru "homing" (ecotaxie) care recunosc specific determinanții antigenici exis-

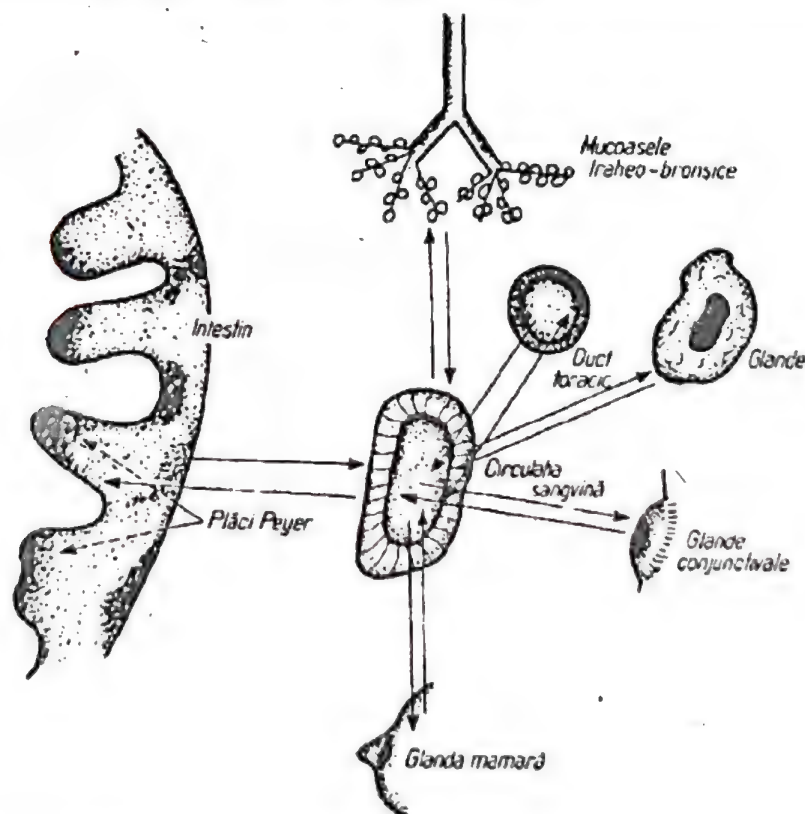


Fig.216. Țesut limfoepitelial asociat mucoaselor (adaptare după P. Brandtzaeg).



tenți la nivelul organelor limfoide, celulelor endoteliale ale tractusului respirator, glandelor salivare etc. Anticorpilor aparținând clasei IgA secretor, datorită structurii lor moleculare - dimeri legați prin lanțul J la penultimul reziduu de Cys - și în special datorită încorporării componentei secretorii, au o remarcabilă stabilitate, acționând ca o "primă linie de apărare specifică" a mucoaselor. Ei pot fixa antigenele solubile sau particulare, adică molecule sau celule bacteriene care, în acest mod, sunt aglutinate și eliminate rapid prin fagocitoză opsonică efectuată în special de către granulocitele PMN cu receptori de membrană pentru fragmentul Fc al acestor anticorpi (Fc $\alpha$ R).

Anticorpilor IgA secretori sunt mult mai aglutinogeni decât cei IgA serici. Datorită acestei proprietăți, ei întârzie colonizarea bacteriilor pe suprafețele dure. Probabil că pentru acest motiv IgA salivară se află încorporată în placa dentară și în pelicula de suprafață unde, după cum arătam, interferează cu aderarea bacteriilor la smalț. Într-adevăr, un nivel scăzut al secreției de către parotidă a anticorpilor IgA este însoțit de o colonizare masivă a bacteriilor *Streptococcus mutans* pe suprafețele molarului. Acești anticorpi nu activează complementul, dar pot neutraliza diferite specii virale, bacteriene, fungice și pot realiza procese de citotoxicitate mediată celular, anticorp-dependentă (ADCC). În ciuda remarcabilei lor rezistențe la acțiunea distructivă a enzimelor, există totuși unele specii bacteriene care produc proteaze distructive. Este cazul germenilor *Streptococcus sanguis*, *S. mitior*, *Capnocytophaga* și altele, implicate în boala periodontală. În cazul în care sunt sintetizate molecule de anticorpi IgA secretorii cu specificitate față de enzimele acestor germeni, situație existentă la unii indivizi și absentă la alții, atunci efectul distructiv periodontal al germenilor amintiți anterior este mult limitat sau chiar anulat. Este remarcabilă variabilitatea de reacție imună specifică a indivizilor față de flora existentă în cavitatea bucală și față de enzimele proteolitice ale acestei flore. Poate așa s-ar explica și variabilitatea individuală înregistrată în patologia stomatologică: subiecți cu dinți perfect normali până la adânci bătrânețe și subiecți cu carii dentare sau periodontite grave, manifestate clinic de la vârste foarte tinere.

În afară de anticorpilor din clasa IgA, există și mici cantități de anticorpi din clasele IgM, IgD și IgG, concentrația acestora în diferite secreții fiind foarte diferită (tabelul 136).

Tabelul 136

Concentrația anticorpilor din clasele IgG, IgA și IgM existentă în diferite secreții (mg/ml)

Secreția	Anticorpi din clasa		
	IgG	IgA	IgM
Plasmă	12,00	4,00	1,00
Colostru	0,20	12,00	0,60
Salivă	0,10	0,30	0,00
Secreții nazale	0,15	1,50	0,00
Secreții duodenale	0,10	0,40	0,20
Secreții jejunale	0,40	0,30	?

În cavitatea bucală, contribuția glandelor la aportul de imunoglobuline diferă nu numai de la o glandă la alta, dar și de la un individ la altul, de la starea de sănătate la cea de boală etc. (tabelul 137).

Tabelul 137

Nivelul imunoglobulinelor din salivă la subiecții normali și la pacienții cu parodontoză (mg/litru; valori medii + DS)

Starea dinților	Imunoglobuline		
	IgG	IgA	IgM
Sănătoși	14,4 + 9,0	194,0 + 53,7	2,1 + 1,9
Parodontoză	69,7 + 33,6	371,4 + 224,7	7,6 + 5,4

În parodontoză, deci, are loc o creștere masivă a anticorpilor aparținând tuturor celor trei clase de imunoglobuline. Această creștere ar putea fi rezultatul stimulilor antigenici de la nivelul cavității bucale, stimuli care activează proliferarea clonală și cooperările celulare. Imunoglobulinele pot fi sintetizate local, cum este cazul unei proporții semnificative de anticorpi IgA secretorii, dar pot fi sintetizate și la nivelul întregului "sistem imunologic comun mucoaselor", sau chiar la nivelul ganglionilor limfatici.

Anticorpilor din clasa IgM, mai puțin rezistenți la degradarea proteolitică decât cei din clasa IgA secretor, activează componentele complementului, putând acționa ca anticorpi compensatori atât la nivelul alveolelor pulmonare și bronhiilor cât și în cavitatea bucală a bolnavilor cu deficit de IgA. Ei sunt sintetizați la nivelul organelor limfoide secundare, cea mai mare parte ajungând la mucoase pe cale circulatorie sau limfatică. Relația directă dintre nivelul seric și cel salivar al acestor anticorpi este o dovadă a originii serice a celor IgM din salivă. Cu cât titrul acestor anticorpi este mai mare în ser, cu atât și cantitatea lor în salivă este mai crescută. Această relație nu există în cazul anticorpilor din clasa IgA.

Imunoglobulinele din clasa IgG aflate în salivă au aceleași proprietăți funcționale ca și cele din circulație. Este și normal să fie așa, deoarece IgG ajung în cavitatea bucală traversând diferite epiteli și în special crevasa gingivală. Tot prin difuzie pasivă ajung și o parte din anticorpilor IgD. O altă parte este sintetizată local, fapt care ar explica de ce în primele 6 luni după naștere nivelul IgD salivar este mult mai mare comparativ cu nivelul seric.

În cazul anticorpilor din clasa IgE, nu se poate vorbi de o sinteză la nivelul cavității bucale. Puținele molecule care au fost decelate în salivă ajung aici printr-un transport selectiv, rostul prezenței lor fiind necunoscut.

### Factori care influențează nivelul imunoglobulinelor salivare

Determinarea cantitativă a imunoglobulinelor salivare este dificilă deoarece recoltarea corectă a salivei întâmpină greutăți de ordin tehnic. Pot exista scurgeri active de anticorpi, contaminări cu secreții lacrimale etc., care modifică datele reale. În afară de aceasta, intervin diverși alți factori care contribuie la variabilitatea rezultatelor. Dintre aceștia, pot fi menționați:

a. *Vârsta.* În saliva nou-născutului se găsesc predominant imunoglobuline din clasa IgG de origine maternă, care persistă cca 2 luni după naștere. De



asemenea, sunt prezente piesa secretorie liberă și cantități foarte mici de anticorpi din clasele IgM și mai ales IgA secretor. Nu se știe precis dacă acești anticorpi sunt de origine maternă sau sunt sintetizați de către fetus. În primele săptămâni de viață se găsesc cantități mari de anticorpi IgD care scad treptat, fiind substituiți cu anticorpi IgA, al căror titru crește constant până la vârsta de doi ani.

*b. Modul de alăptare* a sugarului influențează nivelul salivar al anticorpilor, o parte dintre aceștia fiind probabil transmiși pasiv prin colostru de către mamă.

*c. Statusul dentar* are influență asupra concentrației de IgG, dar nu și de IgA. La persoanele edentate, nivelul IgG scade la  $1/3 - 1/4$  comparativ cu cel existent la normali, fără a se înregistra nici o modificare a nivelului IgA. Dar, prezența cariilor induce o creștere a IgG salivar, probabil ca urmare a unor stimuli suplimentari realizați de către flora bacteriană orală. În general, există o relație inversă între activitatea imună a sistemului glandular-salivar și cariile dentare. Până în prezent, nu sunt date convingătoare și certe care să ateste existența unei relații între nivelul salivar al imunoglobulinelor și parodontopatii sau alte afecțiuni ale mucoaselor.

*d. Alte stări patologice.* În infecții cronice, alergii, în unele boli autoimune, pot exista deficite de IgA salivar. De exemplu, la copii cu amigdalite grave sau cu astm bronșic, nivelul IgA salivar este scăzut. În general, imunoglobulinele salivare scad în deficite ale celulelor B. În spondilita anchilozantă, în dermatite herpetiforme, nivelul lor crește, dar nu se poate stabili o relație strânsă între aceste variații și patologia orală.

#### APĂRAREA CAVITĂȚII BUCALE PRIN MIJLOACE IMUNE MEDiate CELULAR

Existența la nivel oral a mecanismelor de apărare imună mediată celular, având ca efectoare limfocitele și macrofagele, este în afară de orice discuție. Diseminarea acestor celule în mucoasa cavității bucale este determinată de necesitatea intervenției lor directe. De exemplu, în sindromul Sjögren, apar infiltrate limfoide extinse în țesutul parotidian și în alte glande salivare sub formă de "insule mioepiteliale" înconjurate de acumulări masive de limfocite T, macrofage, granulocite PMN și celule B.

Probabil că efectorii imunității mediate celular, cu referire specială la celulele NK și limfocitele Tc, neutralizează celulele epiteliale, musculare etc. infectate viral sau deviate neoplazic. În cazul unor disfuncții, al unor depresii funcționale ale sistemului imun, pot apărea frecvent stomatite aftoase sau chiar procese tumorale care, datorită iritațiilor permanente provocate de către flora bacteriană foarte bogată și de către alimente, pot evolua rapid spre deznodăminte fatale. Limfocitele citotoxice și ajutătoare ajung la acest nivel venind din circulația sangvină și limfatică generală. Ele pot fi stimulate antigenic la nivelul amigdalelor de pildă, după care pot ajunge în organele limfoide, sau pot proveni de la aceste organe limfoide secundare aflate la distanță, cantonându-se în țesuturile orale. O dovadă a intervenției imunității mediate celular la acest nivel este rezultatul benefic obținut prin terapia sistemică cu Cantastim și Antiherpin a ulcerelor și stomatitelor aftoase cu etiologie virală și în special herpetică. Stimularea selectivă sau specifică a clonelor limfocitare și normalizarea rapoartelor dintre diferite subclase de limfocite prin terapia sistemică readuc la normal starea de sănătate a țesuturilor moi din cavitatea bucală. În privința dentiției, cunoștințele referitoare la acest subiect sunt practic nule. Nu este exclus ca parodontitoza cronică, de exemplu, să fie expresia, printre altele, și a intervenției unor componente autoimune mediate celular, dar dovezi categorice în acest sens încă nu există.



Se pare că anticorpii IgA salivari au capacitate de recunoaștere specifică, orientată exclusiv spre antigenele florei orale. Totuși, rolul lor și rezultatele vaccinărilor rămân încă obscure. Este cert că imunizarea enterică este urmată de o creștere a nivelului IgA salivar. Dar și imunizarea subcutanată experimentală cu *S. mutans* asociat cu adjuvant Freund complet a redus incidența cariilor dentare, probabil ca rezultat al acțiunii bactericide și opsonizante a anticorpilor IgG derivați din ser. Se pare că protecția anticarie este mediată mai mult de către anticorpi IgG față de *S. mutans* prin activarea complementului, și nu de către anticorpii din clasa IgA. Deși la om anticorpii IgA salivari pot inhiba colonizarea *S. mutans*, nu se știe totuși dacă pot inhiba și dezvoltarea cariilor, apariția acestora fiind probabil un proces mult mai complex.

Vaccinul anti-carie ar avea după unii rol protector, iar după alții nu ar avea un astfel de rol, deoarece imunizarea pe cale orală sau parenterală față de *S. mutans* nu protejează întotdeauna față de carie. Experimental s-a dovedit că vaccinările anticarie implică stimularea sintezei de anticorpi IgG cu specificitate față de *S. mutans* în special, stimulare care poate genera gingivite incipiente prin complexe imune, deci reacții de hipersensibilitate de tip III și chiar endocardite și nefrite autoimune. De aceea, este de dorit ca vaccinarea să ducă la stimularea anticorpilor din clasa IgA și nu IgG.

Cu toate că sunt încă multe necunoscute, la om au început să fie folosiți în clinică unii imunomodulatori obținuți prin lizate bacteriene, ca mijloace terapeutice sau de prevenire a unor procese supurative, gingivoragii de genul gingivitelor, parodontitelor, abceselor parodontale, alveolitelor supurative etc. De exemplu firma franceză LABORATOIRES DE THERAPEUTIQUE MODERNE LTM comercializează produsul IMUDON format din lizate de:

- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus helveticus*
- *Lactobacillus lactis*
- *Lactobacillus fermentans*
- Streptococi de grup A, H, D
- *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Corynebacterium pseudodiphthericum*
- *Fusiformis fusiformis*
- *Candida albicans*

câte 0,050 g de produs uscat

- Etilmercuritiosalicilat de sodiu - 0,0125 mg
- Excipient q.s. (la un comprimat cca 0,582 g).

Produsul se administrează în doză de câte 4 - 8 comprimate, timp de 6 - 20 de zile. Se suge lent, fără a sfărâma tableta. Incorporarea în lipozomi a unor antigene bacteriene, asocierea vaccinurilor cu imunomodulatori sau adjuvanți, determinarea exactă a căilor de administrare (orală, sistemică, enterală) a dozelor sunt direcții de cercetare viitoare.



## RELAȚII STRUCTURALE ȘI FUNCȚIONALE NEURO - IMUNO - ENDOCRINE

### CONCEPTUL DE STRES

În anul 1936, Hans SELYE într-un articol publicat în revista *Nature* semnală faptul că toți bolnavii, indiferent de boală, au ceva comun între ei, și anume, o stare de epuizare fizică însoțită de febră, paloare, adinamie etc. Această caracteristică particulară, care însoțește alterarea stării de sănătate, a numit-o "sindromul general de adaptare" sau, "sindromul de stres" care se instalează în trei stadii succesive: a) un stadiu inițial de "alarmă" la impactul organismului cu agentul stresant; b) stadiul de "rezistență", de mobilizare a forțelor de apărare și de adaptare la noile condiții și c) stadiul final de epuizare, prezent atunci când agentul stresant acționează violent și prelungit.

Așadar, stres-ul reprezintă reacția organismului la stimuli fizici, chimici, biologici sau psiho-sociali, care-i perturbă echilibrul său fiziologic normal mergând până la efecte letale. Desigur, susceptibilitatea oamenilor la factorii stresanți este foarte diferită, acest factor putând fi foarte nociv pentru un subiect, dar lipsit de importanță pentru altul.

În anul 1948, s-a descoperit existența unor relații particulare între sistemul nervos și cel endocrin, și anume guvernarea hipofizei de către secrețiile hipotalamusului. Ideea că sistemul nervos are funcții secretorii, deși respinsă inițial de "autoritățile" științifice ale timpului, s-a impus, fiind acceptată în cele din urmă datorită dovezilor experimentale indubitabile. Izolarea hormonilor și factorilor eliberați de către neuroni nu a fost ușoară, ea necesitând mari eforturi intelectuale și materiale. De exemplu, numai pentru izolarea "factorului de eliberare a tireotropinei" (TRF-tireotropin releasing factor) a fost necesară disecarea a 5 000 000 creiere de oaie.

Strădanii de amploare similară au fost depuse pentru izolarea "factorului de eliberare a hormonului luteinizant" (LRF = luteinising hormone releasing factor) și a altora. Grație eforturilor de acest gen, s-au reușit elucidarea științifică a proceselor biologice care intervin în instalarea și menținerea stresului și identificarea rolului pe care-l au diverși "factori stresanți" etc. În ultimele două decenii, au fost publicate peste 20 000 de articole și monografii care abordau acest subiect și au fost elucidate multe aspecte referitoare la relațiile neuro-imuno-endocrine în situații de stres. A devenit clar faptul că stresul psihic, de pildă, sau tulburările nervoase și endocrine pot compromite funcțiile imune, iar unii mediatori solubili ai sistemului imun pot influența funcțiile sistemului nervos și endocrin.

În scopul elucidării mecanismelor prin care stres-ul poate provoca alterări grave funcționale și predispune la susceptibilitate față de unele boli, cum ar fi de

pildă boala neoplazică, a fost dezvoltată o direcție de cercetare interdisciplinară, "psiho-neuro-imunologia", un domeniu particular al neuro-imuno-endocrinologiei.

#### UNELE MOLECULE CU IMPLICAȚII ÎN "SINDROMUL GENERAL DE ADAPTARE"

Atât celulele prokariote cât și cele eukariote, printre componentele lor constitutive, au unele familii de molecule care în condiții normale se găsesc în cantități extrem de mici, acumulându-se însă în cantități mari în urma agresiunilor termice, infecțioase etc. Aceste molecule sunt cunoscute sub denumirea de "proteine de stres" sau "proteine de șoc termic" (HSP = heat shock proteins) ce aparțin la diferite familii cu funcții și greutăți moleculare diferite (tabelul 138).

Tabelul 138

Familiiile proteinelor de șoc termic (după S.H.E. Kaufman)

Familia	Membrii	Funcții fiziologice	Rol posibil în răspunsul imun
HSP 90	HSP 90	Prevenirea legării receptorilor steroizi la ADN	Instalarea de reacții autoimune
	HSP 83	Fosforilarea tirozinkinazelor	Conferă rezistență tumorilor
HSP 70	HSP 70	Plierea și deplierea proteinelor	Asamblarea imunoglobulinelor
	grp 78	Translocarea proteinelor	Prelucrarea antigenelor de clasa II
	BiP	Asamblarea complexelor polimerice	Sunt antigene pentru multe bacterii și virusuri
			Instalarea de reacții autoimune
HSP 60	HSP 65	Plierea și deplierea proteinelor	Sunt antigene pentru multe bacterii, virusuri
	grp EL	Asamblarea complexelor multinumerice	Instalarea de autoimunitate
Ubiquitina	Ubiquitina	Degradarea proteinelor	Prelucrarea antigenelor de clasa I
			Realizează ecotaxia limfocitară
			Instalarea de reacții autoimune

Sunt cele mai bine conservate în cursul evoluției filogenetice, prezența lor la bacterii, plante și animale, la care îndeplinesc un rol protector pentru celule, constituind încă o dovadă a unității tuturor formelor de viață de pe pământ.

În mod normal, ele contribuie la translocarea unor proteine prin membranele celulare, la asamblarea și dezasamblarea moleculelor de proteine, la menținerea formei normale a structurii sterice a proteinelor supraveghind și eliminând eventualele aberații care ar putea interveni în cursul "buclării" lanțului polipeptidic primar în vederea realizării de structuri secundare, terțiare etc. Unele se leagă la complexe ADN în timpul replicării celulei, la veziculele "tapitate" cu clathrin în cursul fagocitozei, la unele proteine mitocondriale etc.



În familia HSP 70 există o "proteină de legare" (BiP) care, în timpul sintezei lanțurilor de imunoglobulină de către plasmocit, se leagă la lanțul *H* aflat în reticulul endoplasmic, facilitând conexiunea ulterioară la acesta a lanțului *L* și prevenind astfel legarea prematură *H-H*. În absența lanțului *L*, BiP rămâne atașată la *H*, reținându-l în reticulul endoplasmatic atât timp cât este necesar.

HSP-60 și HSP-70 pot realiza deplicarea unor proteine citoplasmice și translocarea lor ulterioară în reticulul endoplasmic sau în mitocondrii. Odată ajunse aici, ele refac replierea și, atunci când este cazul, contribuie la asamblarea lor în diferite complexe. După unii, aceste proteine ar fi implicate în asocierea  $\beta 2$ -microglobulinei la lanțul  $\alpha$  al antigenelor MHC de clasa I și ar avea rol în recunoașterea și prelucrarea antigenelor străine. Expimarea "proteinelor de șoc termic" de către celulele infectate viral, stresate termic sau transformate neoplazic, ar contribui la evidențierea unor epitopi care ar permite identificarea și eliminarea lor de către sistemul imun. Dar, nu este exclus ca în unele stituații celulele stresate să exprime pe suprafața lor HSP care ar fi recunoscute de către limfocitele *T*, în special de către cele cu receptori  $\gamma\delta$  și de către limfocitele *B*, declanșând reacții autoimune mediate celular și umoral. Existența, în artrita reumatoidă, spondilita ankilozantă, lupusul eritematos sistemic, de anticorpi anti-HSP-65, -HSP-70 și -HSP-90 ar susține această ipoteză. În cazul expunerii celulelor la temperaturi crescute, la infecții virale, la metabolizii oxigenului eliberați în cursul proceselor inflamatorii, în deficite nutriționale sau la diferite noxe, nivelul HSP crește mult, ca expresie a activării genelor de la nivelul complexului MHC, creștere care are rol protector, vital, pentru celula agresionată, asigurându-i în special termorezistență. Desigur, rolul protector benefic pentru celulă poate fi nociv pentru țesuturi, organe sau chiar pentru organism în totalitatea sa. Astfel, creșterea nivelului acestor proteine în interiorul bacteriilor le conferă rezistență față de atacul enzimelor lizozomale ale celulelor fagocitare, favorizând instalarea infecțiilor. Dar și fagocitele care au înglobat bacteriile le produc în cantitate sporită pentru a se apăra, pe de o parte de atacul din interior al acestora și pe de altă parte, de metabolizii oxigenului pe care-i produc în vederea distrugerii materialului fagocitat. Cu alte cuvinte, atât bacteria agresoare cât și organismul agresat folosesc mecanisme similare de protecție unul față de altul. Celulele tumorale cu un nivel crescut de HSP sunt mai rezistente la acțiunea citotoxică a celulelor *NK* sau *LAK* precum și la *TNF* decât cele la care aceste proteine se găsesc la un nivel scăzut. Și celulele normale, încălzite la  $+42^{\circ}\text{C}$ , capătă o rezistență sporită. Faptul că proteinele de șoc termic au determinanți antigenici comuni unui spectru larg de bacterii patogene și de celule transformate, precum și faptul că ele apar rapid după intervenția agenților stresanți, constituie în ultimă instanță un proces benefic pentru organism în totalitatea sa. Acesta face ca, în cazul infecțiilor, sistemul imun să fie activat încă înainte de multiplicarea bacteriilor, alertându-se astfel primele linii de apărare care întârzie consolidarea agresorului și creează o "perdea de protecție" pentru mobilizarea factorilor de apărare specifici, în vederea atât a eliminării agresorului cât și a evitării instalării unor boli autoimune care ar putea fi generate de HSP. Desigur, mecanismele care realizează aceste procese complexe sunt mult mai numeroase și implică intervenția nu numai a unui număr foarte mare de diferite populații moleculare, ci și a unor sisteme funcționale cu rol fiziologic bine precizat. Dar, în ultimă instanță, ele nu fac altceva decât să dovedească încă o dată complexitatea sistemelor multifuncționale ale organismului și integrarea acestora în influențele mediului înconjurător de la care primește semnale și față de care reacționează pentru a-și menține homeostazia.



## CONEXIUNI NEURO-ENDOCRINE

Organismul uman este un întreg armonios, alcătuit din diferite sisteme funcționale care se influențează și se controlează reciproc, în vederea menținerii în limite normale a tuturor funcțiilor lor. Nu există sisteme izolate, independente și indifferente unele față de altele. În consecință, nici sistemele imun, nervos sau endocrin nu funcționează izolat, ci sunt într-o strânsă asociere și colaborare funcțională. De aceea, organele limfoide primare și secundare sunt inervate de filete adrenergice și colinergice și influențate de diverși hormoni. Aceștia sunt secretați de către glandele endocrine, dar și de către organele limfoide primare sau chiar de nervii periferici (tabelul 139).

Tabelul 139

Produse cu funcții de hormoni, secretate de către glandele endocrine, organele limfoide și nervii periferici

Organul secretor	Produsul secretat	Funcția
Hipofiza	Hormoni de creștere (GH) Prolactina Vasopresina ACTH	Activează afluxul precursorilor limfocitelor T către timus
Pituitara	Vasopresina Oxytocina Factorul de eliberare a corticotropinei (CRF)	Stimulează creșterea epiteliului timic
Gonadele	Hormoni androgeni și estrogeni	Reglează proliferarea limfoblaștilor
Tiroida	Hormoni tiroidieni	Modulează sinteza ARN Activează mecanismele oxidative mitochondriale
Pancreasul	Insulina	Stimulează ATP-azele și transportul $K^+$ prin membrana celulară
Suprarenalele	Glucocorticoizi Enkefaline	Inhibiția funcțiilor imune Stimularea sistemului nervos
Timusul	Factorul umoral timic (THF) Timozină V Timulina Timopoiatina	Controlează maturarea limfocitelor T Reglează eliberarea hormonilor hipofizari și unele funcții ale sistemului nervos
Sistemul nervos central și periferic	Substanța P (SP)  Somatostatina  Peptide vasointestinale (VIP) $\alpha$ - endorfine $\beta$ - endorfine Met-enkefaline	Influencează mastocitele și bazofilele în eliberarea de histamină  Controlează eliberarea histaminei de către mastocite  Mediatori potențiali cu acțiune asupra mușchilor netezi, glandelor endocrine, funcțiilor secretorii ale limfocitelor T



În tot acest context funcțional, hipotalamusul are un rol important. El primește informații din periferie și, condiționat de acestea, influențează diferite funcții ca de pildă activitatea sistemului nervos vegetativ și secrețiile endocrine, printre care sinteza și secreția hormonilor adrenocorticotropi (ACTH). Acest control se realizează prin nucleii paraventriculari care sunt în conexiune cu pituitara posterioară, responsabilă de controlul secreției diferiților factori cum ar fi vasopresina, oxitocina, factorul de eliberare a corticotropinei etc.

Hormonii endocrini și diferite neuropeptide pot influența unele funcții ale sistemului imun, celulele acestui sistem având receptori pentru ei (tabelul 140).

Tabelul 140

**Neurotransmițători și hormoni cu proprietăți imunomodulatoare  
(după D.N.Khansari și col.)**

Produsul (factorul) secretat	Acțiunea	Efectul asupra sistemului imun
Glucocorticoizi	Supresie	Sinteza de anticorpi, citokine, activitate citotoxică NK
Catecolamine	Supresie	Proliferarea limfocitelor la stimuli cu mitogene
Acetilcolina	Activare	Crește numărul de limfocite și macrofage în măduvă
Hormoni sexuali	Supresie/Activare	Reacțiile mixte limfocitare
$\beta$ - endorfinele	Activare/Supresie	Sinteza de anticorpi, activarea limfocitelor T și a macrofagelor
Metenkefalinele	Activare	În doze mici activează celulele T
Tiroxina	Activare	Activarea Th (formare de plaje hemolitice)
Dinorfina	Activare	Reacția limfocitelor T la stimuli cu PHA
Prolactina	Activare	Activarea macrofagelor, limfocitelor T (producerea de IL-2)
Hormonul de creștere	Activare	Sinteza anticorpilor, activarea macrofagelor
Vasopresina	Activare	Proliferarea limfocitelor T
Oxitocina	Activare	Proliferarea limfocitelor T
ACTH	Activare/Supresie	Producerea de citokine, activitate NK, sinteza de anticorpi, funcțiile macrofagelor
Somatostatina	Supresie	Răspunsul la mitogeni, sinteza de anticorpi (plaje hemolitice)

De exemplu, de la nivelul sistemului nervos se eliberează GIF (glucocorticoid increasing factor sau "factorul de stimulare a hormonilor glucocorticoizi") care constituie un semnal aferent care acționează pe calea hipotalamus — hipofiză — suprarenale, realizând creșterea concentrației sanguine a corticosteroizilor și, instalarea imunosupresiei. În situații normale, adică în absența unor factori stresanți, această relație neuroimunoendocrină poate avea un rol reglator, de control, asupra răspunsului imun. Astfel, după inocularea antigenului, în faza de răspuns imun maxim, crește și nivelul glucocorticoizilor din circulație. Această creștere este consecința eliberării de către monocitele și limfocitele stimulate a

unor diverși mediatori de genul IL-1; IL-2; IFN $\gamma$  etc., care acționează asupra pituitarei stimulând producerea de ACTH și în final de glucocorticoizi cu efect inhibitor. La rândul lor, limfocitele, macrofagele, granulocitele produc hormoni neuroendocrini care pot influența funcțiile neuronilor și glandelor cu secreție internă (tabelul 141).

Tabelul 141

**Hormoni neuro-endocrini produși de către celulele sistemului imun**  
(după D.A.Weigent și J.E.Blalock)

Hormonul	Celule secretoare	Stimulul care induce secreția hormonului
Hormoni adrenocorticotropi (ACTH)	Limfocite <i>T + B</i>	Infecții virale LPS
Endorfine	Macrofage	Proteina A stafilococică
Tireotropina (TSH)	Celule <i>NK</i>	CRF (Factorul de eliberare a corticotropinei)
Gonadotropina corionică	Limfocite <i>T + B</i>	Reacțiile mixte limfocitare
Hormonii de creștere	Limfocite <i>T + B</i>	Produc spontan hormoni Stimuli cu ConA
Prolactina	Limfocitele <i>T</i>	Stimuli cu ConA
Hormonul luteinizant (LH)	Limfocitele <i>T, B</i> etc.	Inductori ai LH

Hormonii neuroendocrini sintetizați de către celulele sistemului imun au aceeași structură, secvență de aminoacizi, greutate moleculară și activitate biologică, ca și cei produși de către celulele nervoase sau glandele endocrine (tabelul 142). Interacția dintre ei și receptorii de pe suprafața acestor celule activează formarea intracitoplasmatică a unor mesageri de genul cAMP, cGMP etc., dereglarea raporturilor funcționale existente în limite normale între ei și, în final, alterarea funcțiilor celulei.

Tabelul 142

**Receptorii pentru hormonii neuroendocrini existenți pe suprafața celulei sistemului imun** (după D.A.Weigent și J.E.Blalock)

Receptori pentru	Celulele pe suprafața cărora sunt prezenți
Corticotropină	Limfocitele <i>T</i> și <i>B</i>
Factorul de eliberare a corticotropinei (CRF)	Leucocitele mononucleare
Endorfine	Limfocitele <i>T</i> și <i>B</i>
Tireotropină	Limfocitele <i>T</i>
Hormonul de eliberare a tireotropinei (TRH)	Leucocitele mononucleare
Hormoni de creștere (GH)	Leucocitele mononucleare
Substanța P	Limfocitele <i>T</i>
Peptida intestinală vasoactivă (VIP)	Limfocitele <i>T</i>



Diferite limfokine sau monokine pot regla unele funcții neuro-endocrine dându-se a avea adevărate proprietăți de hormoni. De exemplu, interferonii, IL-1 și IL-2, timozina  $\alpha 1$  și  $\beta 4$  provoacă analgezii, stimulează sinteza de *propiomelanocortină* etc. Toate acestea dovedesc că cele trei sisteme folosesc aceleași molecule de semnalizare, prin intermediul cărora se realizează nu numai comunicațiile între diferitele celule aparținând unui sistem funcțional, deci comunicații "intra-sistem", dar și între diferite sisteme, deci "intersistem" (fig. 217).

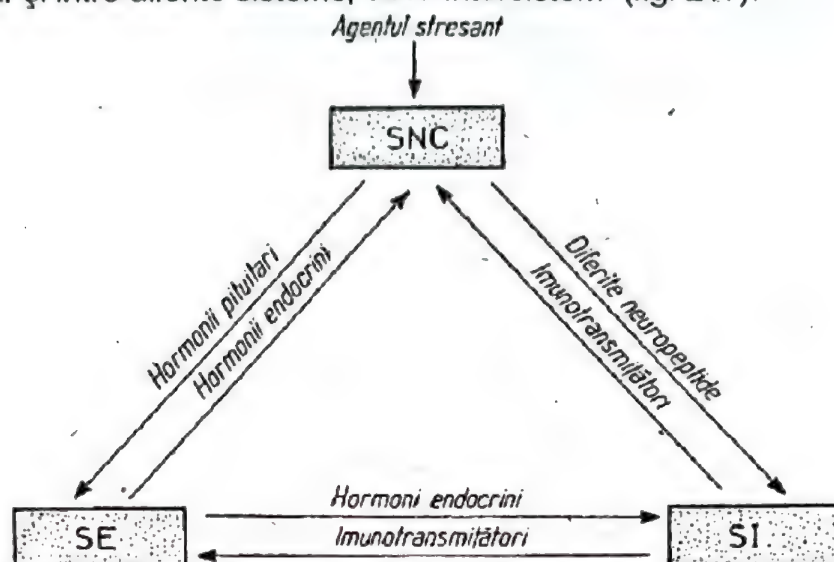


Fig.217. Conexiuni între sistemul nervos central (SNC), imun (SI) și endocrin (SE) care pot fi dereglate de către intervenția intempestivă a unui agent stresant. Aceste trei sisteme se găsesc într-o permanentă "informare reciprocă" prin intermediul unor neuropeptide sau hormoni. O intervenție brutală asupra unuia dintre cele trei sisteme participante la această "triadă" duce la dereglări funcționale grave.

Deci, lanțul reacțional declanșat de către intervenția intempestivă a unui agent stresant antrenează o cascadă de mesaje care perturbă reversibil, dar uneori și ireversibil, o multitudine de funcții biologice (fig. 218).

Organismul este o structură biologică unitară, perfectă. De aceea, modificările care se instalează în unul sau altul din compartimentele sale funcționale vor influența restul organelor sau țesuturilor care, uneori, nu mai pot depăși momentul critic al "stadiului de adaptare".

## FACTORII STRESANȚI

Sindromul "general de adaptare" se poate instala după un impact brutal al organismului cu unii "factori stresanți". Aceștia sunt multipli, unii dintre ei acționând foarte violent, iar alții, care de fapt reprezintă majoritatea, insidios. Este indiscutabil că o infecție bacteriană gravă, o intoxicație alimentară sau chimică pot perturba profund homeostazia, obligând organismul să reacționeze pentru a rezista. Desigur, acești factori acționează brutal, așa că reacția față de ei nu constituie o "surpriză". Dar sunt situații în care întregul echilibru al organismului este deviat în mod lent de la parametrii normali de funcționare de către agenți aparent "inofensivi". Încă de la jumătatea acestui secol, R.DUBOS și J.SCHAEDLER, luând ca indicator raportul existent în mod normal între flora Gram-pozitivă și cea Gram-

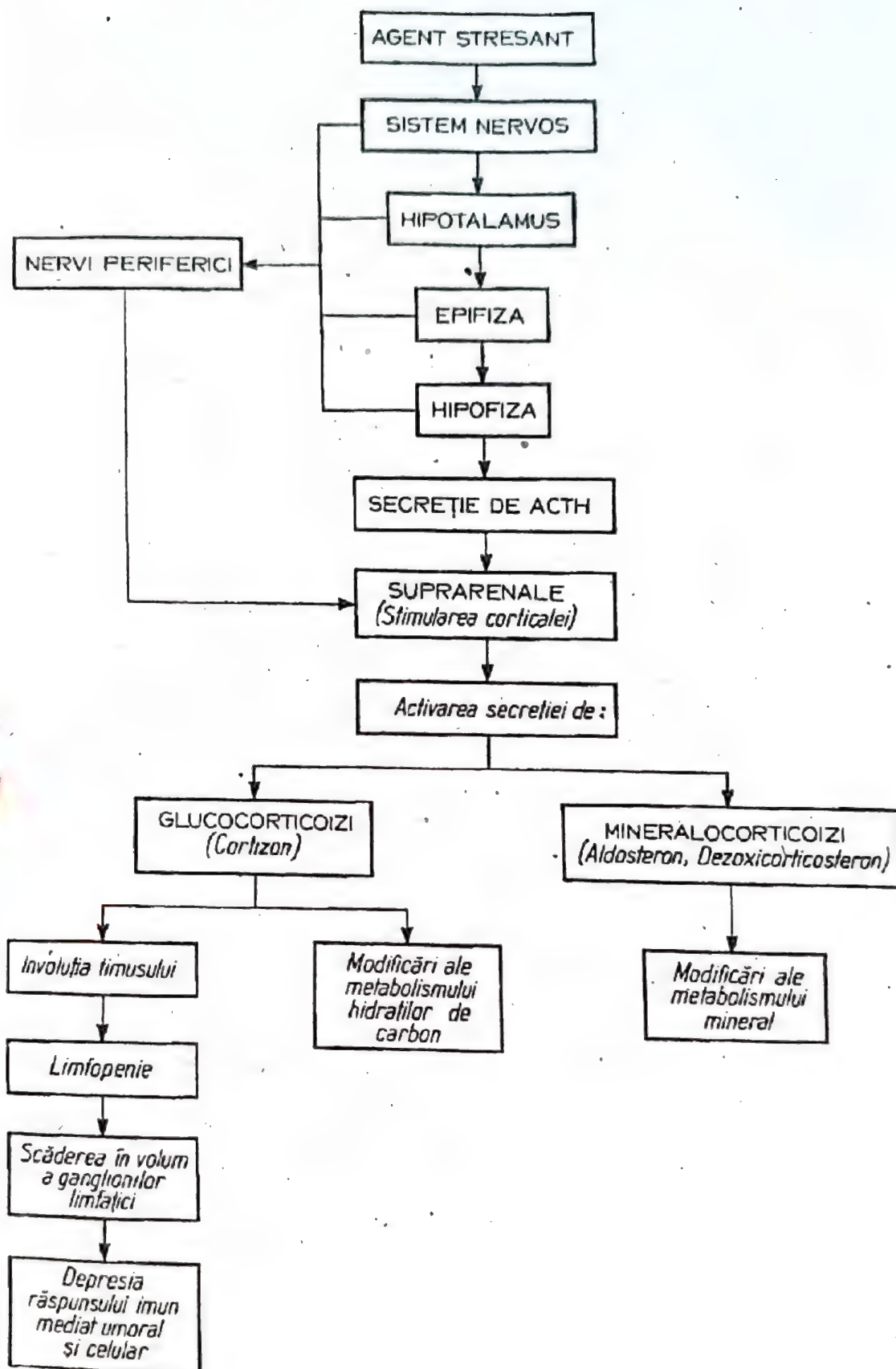


Fig. 218. Conexiuni neuro-imuno-endocrine susceptibile la modificări în cursul sindromului de adaptare.



negativă din intestinul șoarecelui, demonstrau experimental, într-o manieră simplă dar elegantă, că acest echilibru poate fi alterat de către un simplu zgomot sau de conțenționarea animalului; chiar și atunci când manipularea lui se face cu blândețe. Într-un experiment similar, constatam că șoarecii transportați cu mașina pe o distanță de 20 km reacționau slab la stimulii antigenici și deveneau foarte susceptibili la infecții cu germeni condiționat patogeni sau chiar nepatogeni pentru animalele care nu "călătoriseră". Femelele s-au dovedit a fi mai sensibile din acest punct de vedere decât masculii. La aceste animale au acționat în fond niște agenți "psiho-sociali". Venirea în contact, în cutiile în care au fost transportați, cu alți șoareci de care au trăit izolat până atunci, aglomerarea în timpul transportului, manipulările necesare transferului lor din încăperile în care trăiau în mașină, zgomotul motorului etc. au fost tot atâția factori de agresiune.

La oameni, se întâlnesc practic aceleași situații, dar frecvența și complexitatea lor sunt mult mai mari de obicei. Circulația pe străzile aglomerate este mai stresantă pentru conducătorul auto mai puțin experimentat sau străin de oraș, zgomotele prelungite, certurile, neplăcerile la serviciu etc. își pot pune amprenta lor negativă, alterând mai mult sau mai puțin profund *status-quo-ul* individual. Impactul psiho-social este foarte evident la subiecții cu un echilibru fiziologic precar, cum ar fi de pildă cel al pacienților cu tumori solide. Este cunoscut faptul că boala neoplazică este asociată cu o imunodepresie mai mult sau mai puțin evidentă. Un timp, mai ales după extirparea tumorii, majoritatea bolnavilor se simt bine, aproape normal. Este suficient însă un stres psihic sau fizic, intervenit chiar după mulți ani de la operație, care nu are nici o influență asupra persoanelor sănătoase, pentru ca tumora să recidiveze, să metastazeze și să se ajungă la exitus. Cazuri de acest gen sunt foarte numeroase. De exemplu, se pare a fi ilustrativ cazul unei paciente operată în anul 1971 de adenocarcinom mamar. În anul 1988, deci după 17 ani de la operație, pleacă în oraș cu soțul iar la revenirea acasă constată că aceasta a fost jefuită. După aproximativ o lună de zile de la acest eveniment, pe cicatricea de la operație a apărut o mică tumoretă care a crescut vertiginos, bolnava începând să tușească și să slăbească în greutate. Două luni mai târziu, la radiografia pulmonară, se observă zone nodulare opace cu extindere rapidă care au dus la deces. Mai mult ca sigur că în acest caz axul neuro-imuno-endocrin și-a spus cuvântul.

Dar, de multe ori, la același rezultat nefast se ajunge și după excitații cerebrale generate de către "evenimente plăcute". Unui cercetător suferind de cancer pulmonar care, printr-o terapie imunomodulatoare corect aplicată, a putut fi menținut mai mulți ani într-o stare de echilibru fiziologic, i se comunică acceptarea unei lucrări la un congres internațional, fiind invitat s-o susțină. În culmea fericirii pleacă, dar emoțiile, stres-ul de transport, oboseala, au deprimat funcțiile imune favorizând recrudescența și diseminarea tumorii. Desigur, exemple de acest gen sunt numeroase.

Toate acestea sunt dovezi indubitabile ale rolului sistemelor neuro-imuno-endocrine în menținerea homeostaziei, a condiției de "normal". De aceea, dacă nu se pot elimina toate noxele fizice și chimice din natură și toate agresiunile psiho-sociale care însoțesc civilizația actuală, ar fi bine ca cel puțin medicii să cunoască ceva mai mult despre "sindromul de stres". Numai așa ei îi vor scuti pe bolnavi de chemări (uneori inutile) la "control" sau "analize" și de stres-ul generat de așteptarea la ușa cabinetului medical.

## GLOSAR

**AA.** Acid arahidonic.

**Absorbție.** Reținerea în masa unui lichid a unor particule care au venit în contact cu acesta.

**ACTH.** Hormoni adrenocorticotropi.

**ACy.** Adenilat-ciclază.

**AcPh.** Acid fosfatidilic.

**ADCC.** Citotoxicitate mediată celular dependentă de anticorpi (antibody dependent cellular cytotoxicity).

**Adjuvant.** Substanță care mărește imunogenitatea antigenului atunci când este administrată împreună cu acesta.

**ADN.** Acid deoxiribonucleic.

**ADP; ATP.** Adenozin-difosfat; adenozin-trifosfat.

**ATP-ază.** Adenozin-trifosfatază.

**Adsorbție.** Fixarea, "lipirea" unor molecule sau particule aflate în soluție pe suporturi solide de genul bilelor de plastic, hematiilor etc.

**Afinitate (intrinsecă).** Forța de legare realizată între un epitop și un situs combinativ al unei molecule de anticorp.

**Afinitatea funcțională.** Vezi "aviditate".

**Agammaglobulinemie.** Absența sau scăderea imunoglobulinelor în ser până la valori foarte mici, uneori greu de detectat.

**Aglutinare.** Reacție antigen-anticorp care determină formarea de "aglomerate" vizibile.

**Alelă.** Expresie fenotipică a variației unui locus genetic în interiorul speciei.

**Alergie.** Reacție patologică, exagerată ca intensitate, la un stimul antigenic.

**Alexină.** Denumirea inițială a complementului.

**Aloanticorp.** Anticorp care recunoaște aloantigenele.

**Aloantigen.** Antigen codificat de un locus genetic comun. Altfel spus, proteinele unui individ sunt recunoscute ca antigene de către limfocitele altui individ din cadrul aceleiași specii.

**Alogen.** Diferență antigenică între proteinele a doi indivizi din cadrul aceleiași specii.

**Alotip.** Determinanți antigenici la nivelul diferitelor regiuni ale moleculelor de imunoglobuline, caracteristice unor indivizi din cadrul aceleiași specii.

**Amine vasoactive.** Substanțe eliberate de către mastocite, bazofile sau trombocite (histamină, serotonină etc.), cu acțiune asupra endoteliilor și mușchilor netezi.

**Anafilaxie.** Hipersensibilitate de tip I mediată de către anticorpi IgE. (în special fixați citofilic).

**Angajată.** Celulă stimulată, în curs de exprimare a funcției efectoare.



**Anticorp.** Moleculă de imunoglobulină cu funcție de recunoaștere specifică a antigenului.

**Anticorp citofil.** Anticorp care se leagă la membrana plasmatică a celulelor prin fragmentul Fc.

**Anticorpi naturali.** Anticorpi sintetizați ca urmare a unor stimulări naturale și nu deliberate.

**Antigen.** Molecule care induc sinteza de anticorpi.

**Antigen timus-dependent.** Structuri moleculare care necesită, pentru producerea de anticorpi, cooperarea limfocitelor T și B.

**Antigen timus-independent.** Sunt antigene care, pentru a stimula sinteza de anticorpi, nu au nevoie de ajutorul limfocitelor T, fiind suficientă doar participarea celor B.

**Apoptosis.** Moartea programată genetic a celulei.

**Atopie.** Răspuns anormal, exagerat, la un stimul antigenic normal, caracterizat prin producerea masivă de anticorpi din clasa IgE.

**ARN.** Acid ribonucleic.

**Autoantigen.** Molecule potențial antigenice pentru propriul organism, care sunt "tolerate" de către acesta. În cazul ruperii "toleranței", generează răspuns imun și boli autoimune.

**Autocrin.** Acțiunea unui hormon asupra celulei care l-a sintetizat și excretat.

**Autolog.** Component care aparține propriului organism.

**Autosomi.** Cromozomi care nu sunt legați de sex (X și Y).

**Aviditate.** Forța de legare între un antigen complex și toate situsurile combinate ale unei molecule de imunoglobulină. Cu cât anticorpul are mai multe situsuri combinate, deci mai multe valențe, cu atât va lega mai "avid" antigenul.

**Axenic.** Axenos = "lipsit de străini". Animal lipsit de germeni patogeni și nepatogeni. Sinonim: germ-free. Sunt animale crescute în incubatoare speciale după ce au fost extrase prin cezariană și alimentate cu hrană sterilă.

**BHT.** Butirat de hidroxitoluen.

**Blast.** Celulă cu nucleu mare, cu nucleolii evidenți, cu citoplasmă redusă, raportul nucleu/citoplasmă fiind în favoarea nucleului. Este un stadiu intermediar al procesului de diviziune celulară consecutiv unui stimul antigenic sau mitogenic.

**Blastogeneză.** Proces în cursul căruia are loc formarea blasturilor, cunoscut și sub denumirea de "transformare blastică" sau "dediferențiere blastică".

**Boala "pipernicirii".** Un sindrom instalat consecutiv timectomiei neonatale sau iradierii letale a șoarecilor. Animalele nu cresc în greutate, se "pipernicesc", au diaree, părul murdar și aglutinat și sunt foarte susceptibile la infecții bacteriene sau virale. Nu rejectează alogrefele. Cauza acestui sindrom este absența limfocitelor T. Sinonime: "runt disease" sau "wasting disease".

**Booster.** Rapel.

**Bystander cell.** Celulă "spectatoare", care nu participă activ la reacțiile imune.

**By-pass.** "Prin ocolire". Termenul este folosit pentru acele reacții imune care se fac "indirect", adică prin antrenarea altor căi reacționale.

**Cap.** "Bonetă". Moleculele sau complexe moleculare de pe suprafața membranei celulare se aglomerează la un pol al celulei, formând o "bonetă" sau "glugă" care este internalizată.

**Capping.** Termen englez pentru procesul de formare de "glugă" sau "bonetă".

**Captare.** Înglobarea selectivă în celulă a unor molecule străine.

**Carrier.** Gruparea purtătoare din componența antigenului care "poartă" epitopii sau "grupările determinante".

**Cașexină.** Termen sinonim cu TNF- $\alpha$ .



**CD.** "Clusters of differentiation", termen anglosaxon care ar putea fi tradus aproximativ prin "clasele de diferențiere" sau "diferențierea dintr-un grup". Definiște moleculele de pe suprafața celulelor sistemului imun cu proprietăți antigenice specifice.

**CDR.** "Regiune de determinare a complementarității" sau "complementarity determining region". Sunt porțiuni hipervariabile de la nivelul regiunii variabile a moleculelor de anticorp sau a receptorilor pentru antigen de pe limfocitul T, din cadrul situsului combinativ.

**Celulă accesorie.** Celulă cu funcții imune ajutătoare, nespecifice.

**Celulă ajutătoare.** Subpopulație de limfocite T care ajută funcțional alte limfocite T, B etc. în reacția lor față de antigen (termen anglo-saxon: helper). Recunosc antigenul prezentat de către celulele prezentatoare de antigen, în asociere cu moleculele MHC de clasa II.

**Celulă angajată.** Celulă stimulată de către antigen, care se angajează pe o linie de diferențiere, în vederea efectuării unei funcții imune.

**Celulă citolitică.** Termen sinonim cu "celulă citotoxică".

**Celulă citotoxică.** Celulă care ucide specific sau nespecific alte celule.

**Celulă competentă.** Celulă capabilă să recunoască specific și să neutralizeze antigenul.

**Celulă "educată".** Celulă imunocompetentă care a venit în contact cu antigenul.

**Celulă formatoare de plaje hemolitice.** Plasmocit care sintetizează și secretă anticorpi. Dacă este înglobat într-un mediu semisolid în care se găsesc hematii de oaie care au folosit ca antigen, anticorpii antihematie secretați vor difuza în mediul înconjurător, se vor fixa specific pe hematii, formând complexe care pot activa complementul. Liza dată de acesta apare sub formă de puncte transparente în pânda de hematii, cunoscute sub denumirea de "plaje hemolitice".

**Celulă formatoare de rozete.** Celule care pot lega în jurul lor, prin receptorii de membrană, alte celule (des utilizate sunt hematiile) care se dispun în jurul celei formatoare de rozete, sub formă de rozetă.

**Celulă incompetentă.** Celulă tânără care nu și-a exprimat receptorii pentru antigen deoarece încă nu a fost "educată" în "timus" sau măduva osoasă.

**Celulă K ("killer").** Limfocit sau monocit cu receptori pentru Fc, celulă efectoră a citotoxicității ADCC.

**Celulă L.** Limfocit "labil" care fixează labil pe suprafața sa moleculele IgG. La temperatura de 37°C și la pH acid, moleculele atașate se desprind de celulă.

**Celulele limfoide.** Celulele sistemului imun descendente din seria "limfoidă". Clasele majore sunt limfocitele T și B.

**Celula matcă.** Celulă pluripotentă, apărută în sacul vitelin și ficatul embrionar, din care descind toate celulele existente în circulația sanguină. Termenii sinonimi: "șușă", "stem", "formatoare de colonii".

**Celulă de memorie.** Limfocit T sau B care a venit în contact cu antigenul și care exprimă receptori pentru acesta.

**Celulă NK.** Recunoaște selectiv și distruge unele celule tumorale sau infectate, în afara restricției MHC.

**Celulă precursoră.** Celulă tânără, angajată pe o cale de maturare din care va deriva o celulă efectoră a unei funcții imune.

**Celulă prezentatoare de antigen.** Celulă care poate reține și prelucra antigenul, pe care-l prezintă apoi, într-o formă convenabilă altor celule, în asociere cu moleculele codificate de MHC ("sub restricție MHC") sau în afara acestei restricții. Sinonim: APC (antigen presenting cell).



**Celulă "țintă".** Celulă care este ucisă de către celula citotoxică, fiind "țintită" specific sau selectiv de către aceasta.

**Celulă ucigașă.** Sinonim cu celulă citotoxică (killer).

**Celulă "virgină".** Celulă care a fost educată în timus (*T*) sau măduvă (*B*) unde și-a căpătat competența funcțională, dar încă nu a avut ocazia să-și exercite funcțiile deoarece nu a întâlnit antigenul.

**Chemotaxie.** Mișcare direcționată a unei celule sub influența unor agenți chemotactici (care o atrag spre un anumit loc).

**Ciclul celular.** Este un ansamblu de procese biochimice care se finalizează cu diviziunea celulară, celula trecând prin etapele  $G_0$ ,  $G_1S$ ,  $S$ ,  $G_2$  și  $M$ . Replicarea semiconservativă a ADN-ului survine în cursul fazei  $S$ . În faza  $M$  (de mitoză) celula se divide.

**Citofilie.** Proprietatea imunoglobulinelor de a se atașa la celule prin fragmentul  $F_c$ .

**Citokine.** Moleculele solubile care realizează comunicarea între diferite celule controlându-le diferențierea, maturarea etc.

**Citostatic.** Efect biologic exprimat prin inhibiția multiplicării celulei cu blocarea proceselor metabolice, fără acțiune letală asupra ei.

**Citotoxic.** Factori cu acțiune letală asupra celulei.

**Citotoxicitate dependentă de anticorpi.** Vezi ADCC.

**Citotoxicitate dependentă de complement.** Efect citotoxic datorat acțiunii litice a complementului, activat consecutiv fixării specifice (prin *Fab*) a anticorpilor pe suprafața celulei.

**Citotoxicitate mediată celular.** Uciderea unei celule țintă prin intervenția directă a altor celule cu potențial citotoxic.

**Clonă.** O populație de limfocite *T* sau *B* care au receptori cu specificitate de recunoaștere pentru un anumit antigen ("receptor clonotipic").

**Coizogenic.** Vezi *Congenic*.

**Committed.** Celulă angajată pe o anumită direcție de maturare funcțională.

**Compatibilitate.** Celule care exprimă molecule MHC de clasă I sau II, identice.

**Comutare izotipică.** Proces prin care un plasmocit își poate asocia produsul genelor *C* al lanțurilor *H* la produsul genelor *V*. Rezultă o moleculă de anticorp cu aceeași specificitate de recunoaștere a antigenului, dar cu specificitate izotipică diferită (apartine altei clase de imunoglobulină).

**Competiția antigenică.** O depresie specifică a răspunsului imun față de un antigen provocată de răspunsul imun specific altui antigen. Altfel spus, un antigen poate fi "stânjenit" în activitatea sa stimulantă de către un alt antigen.

**Complex major de histocompatibilitate.** Segmentul de cromozom la nivelul căruia sunt loci pentru genele care controlează antigenele de histocompatibilitate.

**Consangvin.** Populație de animale de laborator care are toți indivizii identici din punct de vedere al MHC. Se obțin prin "consangvinizare", adică prin împerechere frate x soră timp de minimum 20 de generații.

**Congenic.** Animale cu genotipuri identice, care diferă între ele doar printr-un singur marker genetic, produs al unei gene. Sinonim: coizogenic.

**Crioglobuline.** Imunoglobuline serice care precipită la temperaturi scăzute (în jur de  $0^{\circ}\text{C}$ ) și se redizolvă o dată cu creșterea temperaturii.

**Degranulare.** Exocitoza granulelor care conțin amine vasoactive sau limfotoxine. Degranulează mastocitele, bazofilele.

**Depleție.** Eliminarea unei celule, molecule, gene etc.

**Depresie.** Diminuarea unei funcții biologice până la valori scăzute, fără anula-rea ei totală.



**Derepresie.** Anularea unui efect inhibitor sau represor, urmată de revenirea la starea normală de exprimare a funcției.

**Determinant antigenic.** Porțiunea din molecula de antigen care îi imprimă specificitatea antigenică. Sinonim : "epitop".

**DFX.** Desferioxamină (chelator al  $\text{Fe}^{2+}$ ).

**DMSO.** Dimetilsulfoxid.

**DMTU.** Dimetiltiouree.

**Domeniu.** Regiunea unui peptid care are o structură primară, secundară și terțiară caracterizată printr-o anumită organizare. Organizarea în domenii caracterizează polipeptidele produse de către genele "superfamilei imunoglobulinelor".

**Ecotaxie.** "Plecarea către casă" a limfocitelor din circulația periferică, adică, cantonarea lor în "ariile specifice" sau de "dependență". Sinonim: homing.

**Efector.** Celulă imunocompetentă care efectuează o anumită funcție imună (citotoxică, de sinteză etc.).

**ELISA.** Enzyme Linked Immunosorbent Assay, sau "dozare imunoenzimatică".

**Endocitoză.** Proces de captare și introducere în interiorul celulei (internalizare) a unor molecule sau particule.

**Endogen.** Element care are origine internă (format în interiorul unei celule, al întregului organism etc.).

**Epitop.** Termen sinonim cu "grupare determinantă".

**Excludere alelică.** Exprimarea fenotipică a unei singure alele dominante, cu inhibarea alelei recesive. Cu alte cuvinte, exprimarea unui caracter în dauna altui caracter care este represat.

**Exocitoză.** Eliminarea în exterior a unor molecule din interiorul celulei.

**Exogen.** Factor sau component care provine din exteriorul organismului.

**Exon.** Segment de genă care codifică pentru o proteină.

**Fab.** Partea moleculei de imunoglobulină de la extremitatea  $\text{NH}_2$  terminală la nivelul căreia se găsește locul de recunoaștere a antigenului (*Fab* = fragment antigen-binding = fragment care leagă antigenul).

**Facilitare.** Prolungirea duratei de supraviețuire a grefei de către anticorpii care recunosc antigenele grefonului.

**Factor reumatoid.** Autoanticorp din clasa IgG su IgM care reacționează cu fragmentul *Fc* al IgG autolog prezent în serul și în lichidul articular al bolnavilor cu artrită reumatoidă.

**Fagocit.** Celulă cu funcție fagocitară.

**Fagocitoză.** Proces prin care se realizează internalizarea și degradarea particulelor introduse intracitoplasmatic.

**Fc.** "Fragment cristalizabil". Porțiunea de lanț greu (*H*) dinspre extremitatea  $\text{COOH}$  terminală, formată din ultimele două sau trei domenii constante care, după digestia enzimatică, cristalizează.

**FcR.** Receptori pe membrana plasmatică a celulelor care fixează citofil *Fc*.

**Feedback.** "Conexiune inversă", sau, "controlul reacției prin produs final". De pildă, anticorpii sintetizați în exces inhibă sinteza altor anticorpi.

**Fenotip.** Caracteristici cu determinism genetic care sunt evidente somatic (sunt "exprimate fenotipic", se "văd").

**Flagelină.** Proteină abundentă în flagelii germenilor Gram-negativi. Sunt antigene timoindependente, sub formă de monomeri dar mai ales de polimeri cu greutatea moleculară mare (100 000 kD).

**Fosfataze.** Enzime responsabile de defosforilarea proteinelor.

**Gammaglobuline.** Globuline serice care în câmp electric migrează în regiunea "gamma" (spre catod). Sinonim: imunoglobuline sau anticorpi.



*Germ-free.* Vezi "axenic".

*GDP; GTP.* Guanidin-difosfat; guanidin-trifosfat.

*Gnotobiotic.* Animale la care se cunoaște precis flora bacteriană cu care sunt contaminate (*gnotos* = cunoscut; *bios* = viață). Practic, din animale axenice se obțin gnotobiotice prin infectarea lor deliberată cu o specie sau mai multe specii de germeni.

*Grupare determinantă.* Vezi "epitop".

*Grupare purtătoare.* Partea din molecula de antigen care "poartă" epitopii (sinonim: "carrier").

*H-2.* Denumirea complexului major de histocompatibilitate la șoarece.

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.* Apa oxigenată sau peroxidul de hidrogen.

*Haplotip.* Ansamblul de alele asociate, existente pe un segment cromozomial.

*Haptenă.* Moleculă de antigen, cu greutate moleculară mică, care poate reacționa cu anticorpul, dar nu poate induce sinteza acestuia (deoarece are nevoie de gruparea "purtătoare").

*Hemocitoblast.* Celulă mare, tânără, derivată din celula matcă.

*Hemoliza în gel.* Tehnică prin care se pune în evidență existența plasmocitelor care secretă anticorpi (vezi "Plaje" - "Celule formatoare de plaje hemolitice").

*Heterolog.* Specificități antigenice aparținând indivizilor unor specii diferite.

*Heterozigot.* Subiecți purtători a două haplotipuri diferite.

*Hibridom.* Linii celulare create *in vitro* prin fuzionarea unor celule tumorale cu limfocite stimulate antigenic. Hibridoamele sunt folosite pentru obținerea anticorpilor monoclonali.

*Himeră.* Coexistența în organismul unui individ a două sau mai multe tipuri de celule care aparțin la indivizi diferiți genetic între ei, fără a se observa reacții imune de eliminare.

*Hiperimunizare.* Imunizare obținută prin administrări repetate de antigen, în scopul obținerii de anticorpi cu titru ridicat.

*Hipersensibilitate.* Răspuns imun anormal de intens față de un stimul antigenic normal, în cursul căruia se pot instala leziuni tisulare.

*Histocompatibilitate.* Compatibilitate între țesuturi, capacitatea unui organism de a accepta grefele de țesuturi acceptabile pentru el sub raportul specificității MHC.

*HLA.* Denumirea complexului major de compatibilitate la om (Human Leukocyte Antigens = antigene leucocitare umane).

*Homing.* Vezi "ecotaxie".

*Homogrefă.* Grefă provenită de la un donator care aparține aceleiași specii din care face parte și receptorul, dar care este diferit sub raportul antigenelor MHC.

*Homozigot.* Indivizi purtători ai unui haplotip unic.

*IÇAM.* Molecule care realizează adeziuni intercelulare (Intercellular Adhesion Molecules = molecule de adeziune interceluară).

*Idiotip.* Ansamblu de caracteristici antigenice ale regiunii variabile a unei molecule de anticorp sau a unui receptor pentru antigen de pe limfocitul T, determinat de configurația sterică a epitopului pe care anticorpul sau celulele îl recunosc specific.

*IFN.* Interferoni.

*IL.* Interleukine.

*Imunitate.* Starea de nereceptivitate, dobândită în urma contactului cu antigenul.

*Imunitate mediată celular.* Răspuns imun efectuat de către celule, putând fi transferat la alt organism numai prin celule.

**Imunitate mediată umoral.** Răspuns imun efectuat de către molecule (anticorpi), care poate fi transferat la alt organism prin administrarea pasivă de ser imun.

**Imunocompetent.** Organism sau celulă competentă imunologic.

**Imunodeficit.** Situație în care răspunsul imun nu se poate realiza la parametrii normali datorită unor disfuncții la nivelul sistemului imun, endocrin etc.

**Imunogen.** Substanță antigenică, care poate declanșa cinetic un răspuns imun.

**Imunoglobuline.** Gammaglobuline cu funcție de anticorpi.

**Imunomodulare.** Procedeu prin care se realizează activarea sau reglarea nespecifică a funcțiilor imune.

**Inactivare.** Distrugerea unei proprietăți biologice prin diferite procedee fizice sau chimice (inactivarea bacteriilor, virusurilor, toxinelor etc.).

**Inbred.** Vezi "consangvin".

**Incompatibilitate.** Neacceptarea, de către sistemul imun al gazdei, a țesuturilor donatorului care diferă la nivelul antigenelor de histocompatibilitate.

**Inhibiție.** Blocarea sau diminuarea potențialului de exprimare a unei funcții sau unui caracter.

**Integrine.** Familii de molecule de adeziune.

**Interleukine.** Molecule secretate de către diferite celule ale sistemului imun sau neimun, cu diferite funcții de mesageri umorali.

**Intradermoreacție.** (IDR). Reacție cutanată la tuberculină sau PPD. Bolnavii de tuberculoză sau cei care au avut contact cu produsele b.K reacționează prin congestie și edem la locul de inoculare a PPD (hipersensibilitate de tip IV).

**Intron.** Segment genetic nefuncțional care nu codifică situat între doi exoni.

**Izoelectrofocusing.** Procedeu de separare a moleculelor pe baza încărcăturii lor electrice. Fiecare moleculă migrează la un pH izoelectric, unde nu sunt nici sarcini electrice pozitive, nici sarcini negative.

**Izogrefă.** Transplantarea unui grefon de la un donator la un receptor identic sub raportul antigenelor MHC. Izogrefa este posibilă numai la gemenii univitelini și la animalele consangvine. Sinonim: singenic.

**Izolog.** Identitate la nivelul MHC între indivizi diferiți care aparțin aceleiași specii și care provin din sarcină univitelină sau, în cazul animalelor de laborator, din consangvinizări.

**Izotip.** Variație genetică în interiorul unei familii de proteine, în cadrul aceleiași specii. Toți indivizii speciei, deși diferă genetic între ei, au același izotip, cum ar fi de pildă structura izotipică a imunoglobulinelor exprimată prin existența celor cinci clase. Toți oamenii normali posedă cele cinci clase de imunoglobulină, deci aceleași specificități izotipice.

**Kinaze.** Enzime care fosforilează proteinele.

**Lanț J.** Lanț de "unire", care leagă monomerii moleculelor în dimeri sau polimeri de imunoglobuline. Este prezent la clasele IgA și IgM.

**Lectină.** Proteine, de regulă de origine vegetală, care se leagă la hidrații de carbon existenți la nivelul membranei celulare, aglutinându-le sau stimulându-le multiplicarea.

**Leucotriene.** Metaboliți ai acidului arahidonic cu rol în procesele inflamatorii. Provoacă bronhoconstricții, vasodilatații etc. Termen prescurtat: LT.

**LFA.** "Molecule asociate funcțiilor limfocitelor", cu rol în adeziunea celulelor (LFA= "lymphocyte function associated").

**LGL.** "Large granular cell", limfocit mare, cu granule citoplasmice. Sunt celule citotoxice K și NK.



**Ligand.** Moleculă care se leagă la un receptor de pe membrana plasmatică a unei celule.

**Linfoblast.** Limfocit transformat blastic.

**Linfokină.** Citokină sintetizată de către limfocite.

**Linfotoxină.** Limfokine cu efect toxic pentru celule, secretate în special de către limfocitele T activate.

**Linie.** Termenul definește o populație de celule sau de animale de laborator cu caractere genetice și biologice bine definite, transmisibile la descendenți.

**Linie germinativă.** Materialul genetic transmis prin gameți. Este informația înscrisă în genom și transmisă de-a lungul generațiilor.

**Linkage.** Transmiterea la urmași a unor gene care se găsesc în poziții apropiate pe cromozom.

**Lipopolizaharizi (LPS).** Molecule existente în pereții germenilor Gram-negativi. Activează complementul pe cale alternativă și sunt mitogene (activatori policlonali) pentru limfocitele B de șoarece.

**Liposom.** Fosfolipide organizate în dublu strat, de regulă de formă sferică, obținute prin dispersia lipidelor în apă. Sunt un instrument util pentru studierea modului de formare a membranei celulare.

**LLC.** Termen prescurtat pentru - "leucemie limfatică cronică" T (LLCT) sau B (LLCB).

**Locus.** Poziția pe cromozom a unei gene (plural "loci").

**LT.** Vezi: leucotriene.

**Macrofag activat.** Macrofag care are funcțiile intens stimulate, consecutiv semnalelor primite de la diverse citokine sau imunomodulatori.

**Macrofag "armat".** Macrofag care a fixat citofil molecule de anticorpi. Prin Fab, acestea recunosc antigenul, iar prin Fc se leagă la FcR de pe membrana macrofagului, făcându-l mult mai eficient funcțional.

**Macroglobulinemie Waldenström.** Proliferarea necontrolată a unor clone de limfocite B care, devenind plasmocite, secretă IgM în cantități mari.

**MAF.** Macrophage Activating Factor = factorul de activare a macrofagelor.

**MAGF.** Macrophage Agglutinating Factor = factorul de aglutinare a macrofagelor.

**MAG.** Monoacilglicerol.

**Marker.** Caracter particular propriu unei populații de celule. Pot fi markeri morfologici, funcționali sau antigenici. Markerii antigenici sunt molecule situate pe suprafața celulelor care pot fi identificate prin diferite tehnici, dintre care cea mai utilizată este cea care folosește anticorpii monoclonali.

**Memorie imunologică.** Capacitatea celulelor limfoide de a păstra informația despre antigen după primul contact cu acesta (stimul primar). La un nou contact (stimul secundar), celulele reacționează mult mai violent.

**MHC.** Major Histocompatibility Complex, sau Complexul major de histocompatibilitate.

**Myasthenia gravis.** Boală autoimună produsă de către anticorpii care blochează receptorii acetil-colinici de la nivelul sinapselor neuro-musculare. Este însoțită de hiperplazie timică și de disfuncții ale acestui organ.

**Mielom multiplu.** Proliferare neoplazică a limfocitelor B care, devenind plasmocite, secretă necontrolat diferite clase de imunoglobuline. Pot fi mieloame monoclonale când se produc în cantități mari imunoglobuline aparținând unei singure clase (IgG, IgA etc.), sau policlonale când sunt secretate concomitent mai multe clase de imunoglobuline.

**MIF.** Macrophage Inhibition Factor = factorul de inhibiție a migrării macrofagelor.



**Mitogen.** Micro- sau macromolecule care stimulează proliferarea policlonală a limfocitelor. Pot fi de origine bacteriană (LPS), vegetală sau animală (lectine, anticorpi anti-limfocitari etc.). Sinonim: activatori policlonali.

**MLR.** Myxed Lymphocyte Reaction sau reacție mixtă limfocitară. Termenul definește stimularea *in vitro* a limfocitelor de către celulele alogene.

**Modulare antigenică.** Înlocuirea temporară a unui determinant antigenic, exprimat pe suprafața celulei, cu un alt determinant. De regulă, "pierderea" temporară a antigenului se face prin "capping" sau prin "raderea" lui de către enzime.

**Monoclonal.** Produs, de regulă imunoglobuline, derivat dintr-o singură clonă de celule, cu unică specificitate de recunoaștere a epitopilor.

**Monokină.** Citokine secretate de către monocite și macrofage.

**Mutagen.** Factor fizic sau chimic care poate induce "mutații" în genomul celular.

**Mutație somatică.** Proces care are loc în cursul maturării celulare. În cazul limfocitelor B, se acționează asupra genelor care codifică pentru regiunea variabilă a moleculei de imunoglobulină, imprimându-i un potențial de recunoaștere specifică a epitopului diferit de cel existent înainte de mutație.

**NADPH.** Nicotin-amid- adenin-dinucleotid-fosfat.

**Neoplazic.** Țesut tumoral.

**Non-responder.** Care "nu răspunde", care nu reacționează la stimulii antigenici sau mitogenici.

**Non-self.** Străin de organism, non-propriu.

**N-terminal.** Extremitatea lanțului polipeptidic cu gruparea aminică  $\text{NH}_2$  liberă.

**-Nu/Nu.** Șoareci atimici congenital. Deoarece sunt lipsiți de păr se mai numesc și "nuzi". Nu au limfocitele T și nu pot rejecta grefele.

**NZB/W.** Tulpină de șoareci care dezvoltă spontan o boală autoimună, asemănătoare lupusului eritematos sistemic al omului.

**Oligoclonal.** Produs de către puține clone de celule.

**Oncofetal.** Caracter comun țesutului embrionar și neoplazic.

**Omolog.** Termen sinonim cu "alogen", semnifică existența unor diferențe genetice la nivelul antigenelor de histocompatibilitate existente la indivizi aparținând aceleiași specii. Asemănător, sinonim.

**Oncogenă.** Genă responsabilă de multiplicarea celulei și, uneori, de deviația neoplazică a ei.

**Opsonină.** Component seric, de regulă anticorp sau complement, care se leagă citofil la membrana celulei fagocitare facilitând fagocitoza.

**Opsonizare.** Proces care facilitează fagocitoza datorită reacției opsoninelor anticorpilor cu antigenul și celula fagocitară.

**Ovalbumină.** Proteină de 44 kD. Este albumina de ou, similară albuminei din serul păsărilor.

**$\text{O}_2^-$ .** Superoxid anion. Specie foarte toxică de oxigen.

**$\cdot\text{O}_2$ .** Singlet oxigen (oxigen "unic"), toxic.

**$^1\text{O}_2$ .** Altă notare pentru oxigenul unic.

**$\text{OH}^\cdot$ .** Hidroxil radical.

**PAF.** Factorul de activare a trombocitelor (Platelet Activating Factor). Este eliberat de bazofile și provoacă agregarea trombocitelor.

**Papaină.** Enzimă proteolitică (endopeptidază) obținută din planta tropicală *Carica papaya*. Hidrolizează proteinele.

**Paracrin.** Acțiunea hormonilor asupra altor celule decât cele care i-au sintetizat.

**Paralizie imunologică.** Lipsa răspunsului imun la un stimul antigenic datorită blocării mai multor clone de limfocite.

**Paratop.** Fața interioară a situsului combinativ, complementară epitopului.



**PCR.** Polymerase Chain Reaction - reacție polimerazică în lanț.

**PDE.** Fosfodiesterază.

**PFC.** Plaque forming cells (celule formatoare de plaje hemolitice *in vitro*).

**PHA.** Fitohemaglutinina, o lectină mitogenă pentru limfocitele *T*, extrasă din *Phaseolus vulgaris*.

**Phytolacca americana.** Plantă din care se extrage PWM, lectină mitogenă pentru limfocitele *T* și *B*.

**PI.** Fosfatidil-inozitol.

**Piesă secretorie.** Proteină asociată cu dimerul IgA secretor, care-i conferă rezistență la atacul enzimatic.

**Pinocitoză.** Proces prin care sunt captate și transportate în interiorul celulei moleculele mici ( $< 0,1\mu$ ).

**PKA, PKC.** Protein-kinaze A sau C.

**PLA, PLC.** Fosfolipaze A sau C;

**Placă Peyer.** Aglomerare limfoidă situată sub mucoasa intestinului subțire. Plăcile Peyer sunt în special la nivelul ileonului și au rol de organe limfoide secundare.

**Plasmafereză.** Metodă de separare *in vitro* a plasmei de elementele figurate ale sângelui, urmată de reinocularea celulelor și reținerea plasmei. Se aplică în scop terapeutic în mieloame multiple pentru îndepărtarea excesului de proteine.

**Plasmocit.** Limfocit *B* ajuns în stadiul final de diferențiere, când sintetizează anticorpi.

**Plasmocitom.** Tumoră formată din plasmocite care secretă activ imuno-globuline.

**PWM.** Pokeweed mitogen, lectină extrasă din *Phytolacca americana*.

**Policlonal.** Produsul mai multor clone de limfocite.

**Polizaharid capsular.** Polimer glucidic de origine bacteriană.

**Premuniție.** Protecție specifică realizată de prezența în organism a unui număr mic de agenți patogeni (bacterii, paraziți). Prezența acestora nu permite penetrarea și multiplicarea altora, cum se întâmplă în tuberculoză, parazitoze etc.

**Prezentator de antigen.** Celulă care prezintă antigenul altor celule (APC sau Antigen Presenting Cells).

**Primed.** Sensibilizat. Termen care definește o populație celulară care are deja informații despre antigen.

**Profil antigenic.** Totalitatea antigenelor exprimate pe suprafața unei celule.

**Propriu.** Termenul definește apartenența antigenelor la organismul din care fac parte și limfocitele.

**Prostaglandine.** Metaboliți ai acidului arahidonic, biologic activi, cu multiple implicații funcționale.

**Proteina A.** Proteină existentă în peretele stafilococilor care se leagă la fragmentul *Fc* al IgG.

**Proteine Bence-Jones.** Dimeri de lanțuri ușoare (*L*) existenți în urina pacienților cu mielomatoză. Precipită la  $60^{\circ}\text{C}$  și se redizolvă la  $90^{\circ}\text{C}$ .

**Proteina C reactivă.** Proteină sintetizată în ficat sub influența unor citokine. Apare în ser numai în cursul proceselor inflamatorii acute sau în cazul unor necroze. Formează precipitate cu  $\text{Ca}^{2+}$  și cu polizaharizii pneumococici.

**Proteina de fază acută.** Sinonim cu proteina C reactivă.

**Proteinkinaze.** Enzime responsabile de fosforilarea proteinelor.

**Pseudogenă.** Genă care are o structură omoloagă altor gene, dar care nu este exprimată funcțional.

**Punct izoelectric.** Valoare a pH-ului în care numărul grupărilor pozitive (bazice) este egal cu cel al grupărilor negative (acide).

*Quenching*. "Stingere". Oprirea unor procese active.

*Radioimunodozare*. Tehnică foarte sensibilă folosită pentru măsurarea concentrațiilor de antigen sau anticorp, care include, pe lângă alți reagenți, și izotopi radioactivi.

*Radio-imuno-assay*. Termen englez pentru "radioimunodozare", adică pentru "dozare imună cu agenți radioactivi".

*Rapel*. Reinocularea antigenului pentru a obține un răspuns imun secundar mai intens.

*Răspuns anamnestic*. Răspuns imun secundar obținut după contactul cu același antigen de care sistemul imun își "amintește".

*Răspuns imun*. Ansamblul modificărilor la nivelul organelor și celulelor sistemului imun, instalate după un stimul antigenic, care ținesc neutralizarea și eliminarea antigenului.

*Răspuns imun primar*. Se instalează după primul contact cu antigenul. Anticorpii aparțin clasei IgM.

*Răspuns imun secundar*. Se instalează după două sau mai multe contacte cu același antigen. Anticorpii aparțin clasei IgG.

*RE*. Reticul endoplasmic.

*Reacție antigen-anticorp*. Modificare rezultată din combinația paratopului cu epitopul. Poate fi cuantificată, manifestându-se ca reacții de precipitare, aglutinare, floculare etc.

*Reacție Arthus*. Sinonim: "fenomen Arthus". Reacție de hipersensibilitate imediată de tip III obținută prin inocularea intravenoasă a serului imun și intradermică a antigenului. După 2-4 ore, la locul de inoculare a antigenului apare un edem indurat, hemoragie, necroză, declanșate de precipitatul antigen-anticorp.

*Reacție GVH*. Reacție grefă contra-gazdă (graft versus host), instalată în cazul transferului de limfocite imunocompetente la un organism incompetent imunologic. Limfocitele mature alogene se multiplică și recunosc ca străine antigenele gazdei pe care le distrug. Organismul gazdă scade în greutate, se pipernicește, splina și ficatul cresc în volum, se instalează diaree gravă iar sfârșitul este letal. Fenomenul imunologic este identic celui de reacție de alogrefă dar, în acest caz, grefa este întregul organism al gazdei.

*Reagină*. Anticorp din clasa IgE care se fixează pe fragmentul Fc al FcεR de pe membrana mastocitelor și bazofililor. Fixarea este urmată de eliberarea de amine vasoactive responsabile de producerea reacțiilor alergice de tip I.

*Rearanjare*. Proces prin care se modifică poziția genelor într-o manieră care realizează diversificări antigenice ale moleculelor.

*Receptor*. Structură complexă, macromoleculară, exprimată la nivelul celulei, prin care aceasta poate lega specific un ligand de la care primește diferite mesaje.

*Recesiv*. Caracter genetic neexprimat fenotipic.

*Recombinare*. Proces care are loc în cursul meiozei, prin care se reorganizează informația genetică. Rearanjările au loc la nivelul ADN, cu implicare de gene care vor codifica pentru sinteza proteinelor.

*Reconstituire*. Repopularea cu limfocite a unui organism cărui i s-au distrus prin iradiere letală celulele sistemului imun.

*Redistribuire polară*. Regruparea, într-un punct de pe membrana celulei, a moleculelor existente pe suprafața ei, care eventual au fixat un ligand (antigen sau anticorp), în vederea internalizării lor.

*Rejecție*. Eliminarea imună specifică a unor țesuturi sau celule alogene sau xenogene.

*Represie*. Inhibarea exprimării unei funcții sau caracter.



**Restricție alogenică.** Obligativitatea existenței de molecule MHC identice atât la nivelul limfocitelor cât și la nivelul celulelor APC, în cursul prezentării antigenului. Limfocitele *T* nu pot recunoaște antigenul dacă acesta este asociat cu molecule MHC alogene.

**Rozete.** Tehnică de identificare a celulelor care au receptori pentru anumiți liganzi, cum este cazul limfocitelor *T* umane care au receptori E pentru hematiile de oaie. *In vitro*, leagă hematiile care se dispun de jur împrejurul limfocitului sub formă de "rozete". Există rozete E (limfocit *T* + eritrocit), rozete EA (limfocit *T* + eritrocit + anticorp), rozete EAC (limfocit *T* + eritrocit + anticorp + complement).

**Runt disease.** Termen englez pentru "boala pipernicirii".

**SBTI.** Soybean trypsin inhibitor.

**Segregare.** Distribuirea genelor în gameți.

**Selecție clonală.** Baza fundamentală a activării limfocitelor, consecutiv stimulării de către antigen numai a clonelor cu receptori pentru el.

**Selecție negativă.** Distrugerea precursorilor celulari de la nivelul timusului (limfocitele *T*) sau măduvei osoase (limfocitele *B*) care au receptori pentru antigenele proprii ale organismului.

**Selecție pozitivă.** Selectarea precursorilor limfocitari la nivelul organelor limfoid primare capabili să recunoască antigenele MHC proprii și epitopii non-proprii organismului.

**Self.** Propriu. Antigene proprii organismului.

**Sensibilizare.** Câștigarea de către limfocite a capacității de a reacționa specific și intens față de un antigen, consecutiv contactului cu acesta.

**Ser.** Lichidul în care circulă elementele figurate ale sângelui, rămas după îndepărtarea acestora și a fibrinei.

**Seroterapie.** Inocularea în scop terapeutic a unui ser imun.

**Sindrom de imunodeficiență dobândită.** Alterarea gravă a funcțiilor imune datorită distrugerii limfocitelor *T* și macrofagelor de către virusul HIV (sinonim: AIDS, SIDA).

**Sinergism.** Cooperare interacțională.

**Singenic.** Animale identice genetic la nivelul tuturor cromozomilor autosomali.

**Sistemul H-2.** Vezi H-2.

**Sistemul HLA.** Vezi HLA.

**Situs de combinare.** Locul de pe moleculă de anticorp prin care aceasta se combină cu antigenul. Sinonim: situs combinativ.

**SOD.** Superoxiddismutază. Enzimă care acționează asupra speciilor toxice de oxigen ( $O_2$ ).

**SpA.** Termen prescurtat pentru proteina A stafilococică.

**Specific.** Modalitate strictă de recunoaștere a unui epitop.

**Specific pathogen free.** Animale lipsite de germeni patogeni, agenți etiologici pentru unele boli infecțioase.

**Splenomegalie.** Creșterea în volum a splinei.

**Steric.** Conformația spațială a unei molecule.

**Stimul antigenic primar.** Primul contact al organismului cu antigenul.

**Stimul antigenic secundar.** Contactul organismului cu un antigen pe care l-a mai întâlnit anterior.

**Strain.** Tulpină. Termen englez care definește o populație bacteriană, celulară sau un grup de animale provenite dintr-un progenitor comun și care au caractere genetice comune.

**Stres.** Sindromul de adaptare la acțiunea distructivă a unor factori de mediu.

**Structură primară.** Secvența aminoacizilor în lanțul polipeptidic.

**Structură secundară.** Aranjarea în spațiu a lanțurilor polipeptidice care, sub influența diferitelor forțe de atracție dintre reziduurile de aminoacizi, se "pliază" conferind moleculei diferite forme sterice.

**Superantigene.** Compuși capabili să activeze policlonal limfocitele T. Sunt de origine exogenă (proteine bacteriene, în special din streptococi, stafilococi și micoplasme) sau endogenă ("proprii" organismului), produse de către gene care stimulează sistemul imun provocând reacții distructive (Gena Mls= minor lymphocyte stimulating).

**Supravegherea imunologică.** Teorie conform căreia sistemul imun al organismului controlează permanent formarea de celule aberante, neoplazice, pe care le elimină.

**Supresie.** Blocarea exprimării unor funcții sau caractere biologice.

**Supresia alotipică.** Inhibiția sintezei unor molecule de imunoglobulină cu o anumită specificitate alotipică.

**Switch.** Cuvânt englez pentru termenul "comutare".

**Șoareci consangvini.** Vezi "consangvin".

**Șoc anafilactic.** Manifestare sistemică, acută, a anafilaxiei, caracterizată prin hipotensiune, bronhoconstricție și tulburări grave respiratorii, cu sfârșit letal.

**Teoria instructivă.** Teorie conform căreia antigenul acționează ca o "matriță" asupra moleculei de anticorp în formare, imprimându-i forma sa complementară.

**Teoria lanțurilor laterale.** Postulează că celulele formatoare de anticorpi au pe membrana lor lanțuri laterale terminate cu o extremitate prin care recunosc specific epitopul. În urma combinării cu antigenul, se desprind și ajung în circulație sub formă de molecule de anticorp, celula exprimând alte lanțuri "laterale".

**Teoria selectivă.** Susține că în organism există celule cu receptori preformați care sunt destinate să recunoască specific epitopii. Spre deosebire de cea a "lanțurilor laterale" care susținea că un limfocit are receptori pentru toți epitopii din natură, cea selectivă susține că în organism sunt atâtea clone (ramuri, linii) de celule câți epitopi sunt în natură, fiecare clonă exprimând receptori pentru un singur epitop pe care este predestinat să-l recunoască.

**Test de inhibiție.** Metodă serologică prin care se inhibă posibilitatea reacției specifice dintre un ser imun sau celule efectoare și antigenul respectiv.

**Test de neutralizare.** Evaluarea cantitativă a anticorpilor pe baza capacității lor de a neutraliza efectele biologice ale unui antigen.

**Test de transformare blastică.** Vezi "blastogeneză".

**Test Mantoux.** Vezi "intradermoreacție".

**Timectomie.** Extirparea timusului.

**Timidină tritiată.** Nucleotid pirimidinic, precursor al ADN, marcat cu izotopul hidrogenului  $^3\text{H}$  (tritiu).

**Timp de înjumătățire.** Timpul necesar, exprimat în zile, pentru a se reduce la jumătate numărul de molecule existent într-o populație omogenă de molecule.

**Titru.** Raportul invers al celei mai mari diluții dintr-un ser imun care mai reacționează specific cu antigenul, formând precipitate sau aglutinate vizibile cu ochiul liber.

**Tulpină.** Vezi "strain".

**Toleranță.** Areactivitate imunologică specifică față de un anumit antigen.

**Tolerogen.** Produs care poate induce toleranța imunologică.

**TPCK.** L-1-tosiamid, 2-fenil-etil, clorometil-cetonă.

**Transfer de celule.** Inocularea unei suspensii de celule, recoltate de la un organism, altui organism.



**Turnover.** Durata de viață a unei celule, definită ca interval de timp dintre două diviziuni mitotice sau dintre o diviziune mitotică și moartea ei. Sinonim cu durata de viață a unei molecule existentă în ser sau pe membrana celulară.

**Tx.** Tromboxani, derivați din acidul arahidonic pe cale ciclooxygenazică.

**Țesut limfoid.** Totalitatea componentelor sistemului imun: organe limfoide primare, secundare, celule etc.

**Ultracentrifugare.** Centrifugare la viteză înaltă, peste 100 000 de rotații/minut.

**Ultrafiltrare.** Metodă de separare cu ajutorul membranelor care au pori mici, cu diametre bine cunoscute, a moleculelor aflate într-un amestec cu alte molecule de dimensiuni diferite. Prin porii membranei vor trece numai moleculele cu dimensiuni mai mici. Procedul este folosit și pentru separarea virusurilor de bacterii.

**Umoral.** Sistem alcătuit din molecule aflate în soluții (umori). În imunologie se folosește termenul "răspuns imun umoral" care semnifică existența unui răspuns efectuat de către anticorpi.

**Unitate Svedberg.** Definește coeficientul de sedimentare a moleculelor egal cu  $10^{-13}$  secunde. De exemplu, coeficientul de sedimentare  $7 \cdot 10^{-13}$  se notează 7 S, cel  $19 \cdot 10^{-13}$  se notează 19 S etc.

**Uropod.** Porțiunea alungită a celulei prin care se fixează la un punct fix de pe suprafața pe care se deplasează celula respectivă (granulocit PMN) și care prin contracție ajută la deplasarea întregii celule în sensul aducerii extremității opuse, "posterioare", în dreptul uropodului fixat, desprinderii acestuia și fixării la alt punct mai îndepărtat etc.

**Urticarie.** Erupție papuloeritematoasă cutanată, însoțită uneori de mâncărimi ale pielii. Apare în hipersensibilitatea de tip I, mai ales atunci când alergenul a fost introdus în organism pe cale bucală.

**Vaccin.** Produs biologic cu proprietăți imunizante care poate conferi protecție față de o boală provocată de bacterii, virusuri sau paraziți. Un vaccin trebuie obligatoriu să fie apatogen și imunogen.

**Vaccinare.** Inocularea parenterală sau orală a unui vaccin.

**Valență.** Numărul de grupări determinante sau de situsuri combinate existente pe o moleculă de antigen, respectiv pe o moleculă de anticorp.

**Variație antigenică.** Vezi "modulație antigenică".

**VIP.** Peptidă intestinală vasoactivă.

**VLA.** Molecule din familia integrinelor cu rol în aderarea intercelulară. Sunt inițialele cuvintelor "Very Late Antigen" (antigen exprimat foarte târziu).

**VN.** Vitronectină. Moleculă din familia integrinelor, cu rol în adeziunea celulară.

**Xenogen.** Diferențe antigenice existente între celulele și țesuturile unor indivizi care aparțin la două specii diferite ("Xenos" = străin). Sinonim = heterolog.

**Xenogrefă.** Sinonim cu "heterogrefă" sau cu "grefă heterologă".

**Xenotip.** Tip antigenic distinct, specific unei specii și străin altei specii.

**Zimozan.** Polizaharizi insolubili, izolați din peretele celular al drojdiei de bere (*Saccharomyces cerevisiae*), care pot activa pe cale alternativă complementul.

**Zimozan opsonizat.** Complex format din zimozan și anticorpii IgG cu specificitate pentru zimozan, utilizat pentru studiul receptorilor Fc de pe membrana plasmatică a unor celule, în special a macrofagelor și granulocitelor PMN.



## BIBLIOGRAFIE

- AKBAR A.N., SALMON M., JANOSSY C. - *The synergy between naive and memory T cells during activation*, Immunol. Today, 1991, 12, 184 - 188.
- ALBERTS B., BRAY D. - *Molecular biology of the cell*, In: "Garland Publishing Inc.", New-York, 1983, pp. 319 - 384, London.
- ALEXANDER D., SHIROO M., ROBINSON A., BIFFEN M., SHIVAN E. - *The role of CD45 in T-cell activation. Resolving the paradoxes?*, Immunol. Today, 1992, 13 (12), 477-480.
- ALLISON J.P., LANIER L.L. - *The T-cell antigen receptor gamma gene: rearrangement and cell lineages*, Immunol. Today, 1987, 8, 293 - 296.
- ANDRIEȘ L., OLINESCU A. - *Compendiu de Imunologie Fundamentală*, Editura "Știința", Chișinău, 1992.
- AUDIBERT F.M., LISE L.D. - *Adjuvants: Current status, clinical perspectives*, Immunol. Today, 1993, 14 (6), 281 - 284.
- BACH J.F. - *Immunosuppressive therapy of autoimmune diseases*, Immunol. Today, 1993, 14 (6), 322 - 326.
- BAGGLIONI M., DEWALD B. - *The neutrophil*, Int. Arch. Allergy appl. Immunol., 1985, 76, 13 - 20.
- BALKWILL F. - *Cytokines - soluble factors in immune responses*, Curr. Opinion Immunol., 1988, 1, 241 - 249.
- BANCHEREAU J. - *Interleukin 4*, Nucl. Med. Biol., 1990, 17, 619 - 623.
- BELLANTI J.A., ROCKLIN R.E. - *Immunology III*, Philadelphia W.B. Saunders Company, 1985.
- BERNIER G.M. - *Immunoglobulins*, Progr. Allergy, 1970, 14, 1 - 36.
- BIER O.G., DIAS DA SILVA W., MOTA I. - *Fundamental of Immunology*, Berlin, New-York, Springer -Verlag 1981.
- BODMER J.G., MARSH S.G.E., ALBERT E. - *Nomenclature for factors of the HLA system*, Immunol. Today, 1990, 11, 3 - 7.
- BOUCK N. - *Tumor angiogenesis. The role of oncogenes and tumor suppressor genes*, Cancer Cell, 1990, 2, 179 - 186.
- BRANDTZAEG P. - *Salivary Immunoglobulins*, In: Human saliva. Clinical Chemistry and Microbiology, Vol. II, Ed. J.O. Tenovuo CRC Press Boca Eaton, Florida, 1989.
- BRAQUET P., TOQUI L., SHEN T.Y., VARGAFTIG B.D. - *Perspectives in Platelet-activating Factor Research*, Pharmacol. Reviews 1987, 39, 94 - 145.
- BURGRAEVE M. - *Monument a E.D. W. Jenner ou histoire de la vaccine a l'occasion du première centenaire de son invention*, Librairie de la Cour, Bruxelles, 1875, pp 7 - 8.
- CHIRIGOS M.A., TALMADGE J.E. - *Immunotherapeutic agents: their role in cellular immunity and their therapeutic potential*, Springer Seminar in Immunopathology, 1985, 8, 327 - 341.
- COFFMAN R.L., SEYMOUR B.W.P., LEBMAN D.A. et al. - *The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation*, Immunol. Rev., 1988, 102, 5 - 28.
- CONRAD D.H. - *Fcε RII/CD23. The low affinity receptor for IgE*, Ann. Rev. Immunol., 1990, 8, 623 - 645.
- COOMBE D.R., RIDER Ch.C. - *Lymphocyte homing receptors cloned. A role for anionic polysaccharides in lymphocyte adhesion*, Immunol. Today, 1989, 10, 289 - 291.



## CUPRINS

INTRODUCERE.....	3
ANTIGENE .....	9
Condiții și factori care determină antigenicitatea .....	10
Organizarea structurală a moleculei de antigen .....	12
Factori care influențează specificitatea antigenică .....	16
Antigene heterofile .....	18
Tipuri de antigene și criterii de clasificare a lor .....	19
Reacții antigenice încrucișate .....	35
Competiția antigenică .....	36
Vaccinuri .....	37
MIJLOACELE SPECIFICE ALE APĂRĂRII IMUNE .....	41
Organele limfoide .....	41
Celulele sistemului imun .....	53
Efectorii umorali ai imunității .....	115
Markerii celulelor sistemului imun .....	197
Molecule de adeziune .....	208
Receptorii de membrană .....	215
SEMNALE ȘI MESAGERI LA NIVEL CELULAR .....	254
Semnale biochimice intracelulare .....	261
DETERMINISMUL GENETIC AL FUNCȚIILOR IMUNE .....	270
Complexul major de histocompatibilitate (MHC) .....	271
Structura genelor MHC .....	280
Baza genetică pentru diversitatea unităților de recunoaștere a antigenului .....	288
COOPERĂRI CELULARE ÎN RĂSPUNSUL IMUN .....	304
DINAMICA RĂSPUNSULUI IMUN. MECANISME CARE INTERVIN ÎN NEUTRALIZAREA ANTIGENULUI .....	324
Mecanismele efectoare care intervin în neutralizarea antigenului .....	331
Încercări de utilizare practică a unor efectori ai imunității .....	334
MECANISME DE REGLAREA RĂSPUNSULUI IMUN .....	339
	505



EVOLUȚIA SISTEMULUI IMUN ȘI A FUNCȚIILOR SALE .....	353
Filogenia imunocompetenței .....	353
Ontogenia imunocompetenței .....	364
IMUNITATEA ANTIVIRALĂ, ANTIBACTERIANĂ ȘI ANTIPARAZITARĂ .....	372
Caracterele generale ale virusurilor și bacteriilor patogene sau saprofite.	
Relații ale acestora cu organismul gazdă .....	372
Diferite modalități de apărare antiinfecțioasă a mamiferelor .....	375
Apărarea imună în infecțiile parazitare .....	386
IMUNITATEA ANTITUMORALĂ .....	394
DEVIAȚIILE RĂSPUNSULUI IMUN .....	410
Toleranța imunologică .....	411
Hipersensibilitatea imunologică .....	419
Autoimunitatea .....	429
MODULAREA NESPECIFICĂ A RĂSPUNSULUI IMUN .....	439
MIJLOACE DE APĂRARE IMUNĂ LA NIVELUL CAVITĂȚII BUCALE .....	461
RELAȚII STRUCTURALE ȘI FUNCȚIONALE NEURO-IMUNO-ENDOCRINE .....	468
Conexiuni neuro-endocrine .....	471
GLOSAR .....	477
BIBLIOGRAFIE .....	495
INDEX ALFABETIC .....	491



**Lei 9980**

**ISBN 973-30-3066-X**

**EDITURA DIDACTICĂ ȘI PEDAGOGICĂ, R.A. – BUCUREȘTI, 1995**



Scanned with OKEN Scanner